Vol. 15 1944

ARQUIVOS

DO

INSTITUTO BIOLOGICO

• Departamento da Defesa Sanitária da Agricultura •

IMPERIAL MYCOLOGICAL
4 AUG 1945
INSTITUTE

SECRETARIA DA AGRICULTURA
SÃO PAULO
BRASIL

Os Arquivos do Instituto Biologico aparecem sob a forma de artigos separados publicados à medida de sua apresentação, os quais anualmente são reunidos em um volume, que pode ser adquirido por permuta ou compra pelo preço marcado na capa.

Os artigos separados, impressos em numero limitado, são obtidos apenas por permuta.

Toda correspondencia referente aos Arquivos deve ser dirigida ao Superintendente do Instituto Biologico, (Departamento de Defesa Sanitária da Agricultura) Caixa postal 119-A, São Paulo, Brasil.

Superintendente - Prof. Dr. H. da Rocha Lima.

The "Arquivos do Instituto Biologico" appear in the form of separate articles published as they are presented, and are annually united in one volume, which may be acquired by exchange or purchase at the price indicated on the cover.

The separate articles, a limited number of which is printed, may be obtained by exchange.

All correspondence referring to the "Arquivos" should be addressed to - Superintendente do Instituto Biologico, P. O. Box 119-A - São Paulo, Brazil.

PREÇO DESTE NUMERO CR$ 30,00

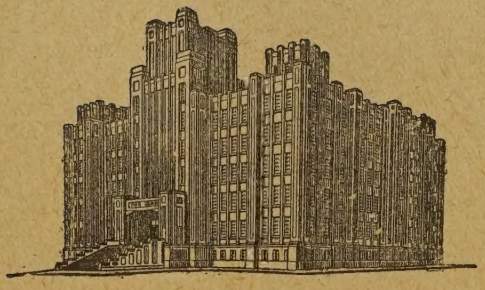
Vol. 15 1944

ARQUIVOS

DO

INSTITUTO BIOLOGICO

• Departamento da Defesa Sanitária da Agricultura •



SECRETARIA DA AGRICULTURA
SÃO PAULO
BRASIL

SUMÁRIO

Pags.

1. **Silberschmidt, K. e A. R. Campos** — ESTUDOS RELATIVOS À DOENÇA "SUPERBROTAMENTO" OU "ENVASSOURAMENTO" DA MANDIOCA — Estampas 1-4.
Studies about the "Superbrotamento" or "Envassouramento" of Cassava 1-26

2. **Meyer, J. R.** — AÇÃO BACTERIOSTÁTICA DE UM COGUMELO MACROSCÓPICO PERTENCENTE À FAMÍLIA DAS POLIPORÁCEAS "POLYPORUS CINNABARINUS (JACQ.) FRIES."
Bacteriostatic Activity of a Macroscopic Fungus belonging to the Polyporaceae Group "Polyporus cinnabarinus (JAQ.) FRIES." 27-36

3. **Nobrega, P. e R. C. Bueno** — VERIFICAÇÃO DA PULOROSE EM URU (ODONTOPHORUS CAPUEIRA).
Pullorum Disease in the "Uru" (Odontophorus capueira) . . 37-38

4. **Reis, J. e A. S. Reis** — SÔBRE O USO DE DESINFETANTES NA ÁGUA DE BEBIDA, PARA PREVENÇÃO DA CÓLERA AVIÁRIA.
On the addition of Desinfectants to the Drinking Water to prevent Fowl Cholera 39-41

5. **Rodrigues, C. e V. O. Guida** — SUBSTRATOS APROPRIADOS PARA O TRANSPLANTE DE ANAERÓBIOS, DIRETAMENTE DE COLÔNIAS DESENVOLVIDAS NA SUPERFÍCIE DE PLACAS.
Adequate Substrata for the Transfer of Anaerobes directly from Colonies developing on the Agar Blood Surface 43-58

6. **Souza, D. A. e C. Amato** — ADAPTAÇÃO DO MÉTODO DO DENSÍMETRO PARA A DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DAS PARTÍCULAS DO ARSENIATO DE CHUMBO — Com 8 figuras no texto.
Adaptation of the Hydrometer Method for the Determination of the Particle Size of Lead Arsenate 59-71

7. **Galvão, P. E., J. Pereira e J. Papaterra Limongi** — QUOCIENTE DE OXIDAÇÃO DO ÁCIDO LÁTICO NAS DIVERSAS PARTES DO ENCÉFALO DE MAMÍFERO — Com 1 figura no texto.
Lactic Acid Oxidation Quotient in different parts of Mammal Brain 73-79

8. **Bueno, P.** — ESTUDOS SÔBRE A PESTE SUINA. I — O PAPEL DA ASSOCIAÇÃO MICROBIANA.
Studies on Swine Fever. I — The Rôle of Associated Bacteria 81-86

(CONTINUA)

Pags.

9. **Bueno, P.** — ESTUDOS SÔBRE A PESTE SUINA. II — A REAÇÃO DO SISTEMA RETÍCULO-ENDOTELIAL — Estampas 5-8.
Studies on Swine Fever. II — The Reaction of the Reticulo-Endothelial System 87-96

10. **Silberschmidt, K. e H. Lopes Torres** — ALGUMAS OBSERVAÇÕES SÔBRE O MECANISMO DA ACUMULAÇÃO DO "NICOTIANA VIRUS 1 (MAYER) ALLARD" EM FÔLHAS DE FUMO — Com 6 figuras no texto e estampas 9-10.
Some observations on the Mechanism of the Accumulation of the "Nicotiana-Virus 1 (MAYER) ALLARD" *in Tobacco Leaves* 97-140

11. **Arruda, S. C.** — A "ESCALDADURA DAS FÔLHAS", DOENÇA DA CANA DE AÇUCAR, NOVA NO BRASIL — Estampas 11-15.
Leaf Scald a Disease of Sugar Cane new to Brazil 141-196

12. **Bergamin, J.** — O "REPASSE" COMO MÉTODO DE CONTROLE DA BROCA DO CAFÉ "HYPOTHENEMUS HAMPEI (FERR., 1867)" (COL. IPIDAE) — Com 2 figuras no texto.
The "Repasse" as Control Measure for the Coffee Berry Borer "Hypothenemis hampei (FERR., 1867)" *(Col. Ipidae)* . . . 197-208

13. **Carneiro, V.** — ESTUDOS DE IMUNIDADE CRUZADA ENTRE O VIRUS BRASILEIRO DA ENCEFALOMIELITE INFECCIOSA DO CAVALO E OS VIRUS AMERICANOS — PELAS PROVAS DE SORO-NEUTRALIZAÇÃO.
Immunological Relationships between the Brazilian and the American Viruses of Equine Encephalomyelitis, through Cross-Neutralisation Tests 209-238

14. **Pereira, C. e M. P. de Castro** — MORFOLOGIA EXTERNA E ANÁLISE DOS CARACTERES TAXONÔMICOS DE "PYCNOCHERNES EIDMANNI BEIER, 1935" (CHELONETHIDA: CHERNETIDAE), DAS PANELAS DE LIXO DOS FORMIGUEIROS DE "ATTA SEXDENS RUBROPILOSA FOREL, 1908" — Com 8 figuras no texto.
External Morphology and Analysis of the Taxonomic Characters of "Pycnochernes eidmanni BEIER, 1935" *(Chelonethida: Chernetidae) from the refuse chambers of the nests of "Atta sexdens rubropilosa* FOREL, 1908" 239-261

15. **Moreira, J. e C. H. Florence** — OSTEOFIBROSE DOS EQUÍDEOS NO BRASIL, "CARA INCHADA" — Estampas 16-25.
Osteofibrosis in Equines in Brazil, "Cara inchada" 263-288

16. **Figueiredo Jr., E. R. de e Hyder F. Pereira** — NOTAS SÔBRE "XANTHOPASTIS TIMAIS (CRAM.)" (LEP. NOCT.), PRAGA DAS AMARILIDÁCEAS — Com 15 figuras no texto.
Notes on "Xanthopastis timais (CRAM.)" *(Lep. Noct.), Pest of Amaryllidaceae* 289-298

(CONTINUA)

17. **Lepage, H. S.** e **O. Giannotti** — ALGUMAS ESPÉCIES NOVAS DE COCCÍDEOS DO BRASIL (HOMOPTERA-COCCOIDEA) — Com 32 figuras no texto e estampa 26. Pags.

Some new species of Brazilian Coccidae (Homoptera-Coccoidea) 299-306

18. **Nobrega, N. R.** e **K. Silberschmidt** — SÔBRE UMA PROVAVEL VARIANTE DO VIRUS "Y" DA BATATINHA (SOLANUM VIRUS 2, ORTON) QUE TEM A PECULIARIDADE DE PROVOCAR NECROSES EM PLANTAS DE FUMO — Estampas 27-29.

On a Suspected Variant of the Potato Virus "Y" (Solanum virus 2, ORTON*) which causes Necrosis on Tobacco Plants* . . 307-330

19. **Carneiro, V.** — COMPORTAMENTO DO VIRUS DE ENCEFALOMIELITE INFECCIOSA DO CAVALO POR INOCULAÇÃO NA MEMBRANA CORIOALANTOIDE DE EMBRIÃO DE MARRECO.

The Behavior of the Virus of Equine Encephalomyelitis on the Chorioallantoic Membrane of the Duck Embryo 331-338

20. **Nobrega, P.** e **R. C. Bueno** — SÔBRE O RECONHECIMENTO DE PORTADORES NA CÓLERA AVIÁRIA.

On the Detection of Fowl Cholera Carriers 339-342

21. **Jenkins, Anna E.** e **A. A. Bitancourt** — IDENTIDADE DO HOSPEDEIRO DE "ELSINOË BOEHMERIAE BITANC. & JENKINS".

Correct Host of "Elsinoë boehmeriae BITANC. & JENKINS" . . 343-344

Vol. 15 — Art. 1 Agosto de 1944

ESTUDOS RELATIVOS À DOENÇA "SUPERBROTAMENTO" OU "ENVASSOURAMENTO" DA MANDIOCA

POR

K. Silberschmidt e A. R. Campos

Do Instituto Biológico de S. Paulo

Com as estampas 1-4

HISTÓRICO

A doença da mandioca, chamada "Superbrotamento" ou "Envassouramento", foi observada, pela primeira vez em 1939, em Viçosa, Minas Gerais.

A ocorrência dessa doença no Estado de São Paulo foi primeiramente verificada em 1941, no município de Lins, na zona Noroeste. Desde então ela se disseminou por alguns municípios próximos de Lins, como os de Avanhandava, Promissão e Penápolis. Conforme valiosas informações que devemos à gentileza do sr. R. DRUMMOND-GONÇALVES, Chefe da Seção de Fitopatologia do Instituto Biológico, mostraram-se mais recentemente infeccionados pelo "Superbrotamento" também os mandiocais do município de Rio Preto, e talvez de alguns outros municípios do Estado. Dados mais detalhados sobre a disseminação e importância económica dessa doença são encontrados no folheto intitulado: O "Superbrotamento" ou "Envassouramento" da mandioca, da autoria de R. DRUMMOND-GONÇALVES, E. S. NORMANHA e OLAVO J. BOOCK e publicado pela Secretaria da Agricultura de São Paulo (10, 1942).

Visando esclarecer o modo de transmissão dessa doença, iniciamos em fins de 1940, sob condições controladas, estudos acerca da natureza do seu agente causador. É objetivo do presente trabalho apresentar os resultados dêstes estudos.

Antes de passar à exposição das nossas experiências relativas à transmissão experimental da doença, achamos necessário dar aqui uma descrição dos seus principais sintomas.

DESCRIÇÃO DOS SINTOMAS

Observando no campo plantas de mandioca doentes ao lado de outras sadias, o que mais chama a atenção é, nas primeiras, o número excessivo de brotos que cada caule emite, os quais são sempre dirigidos para cima e formam um ângulo agudo com a haste principal. Em

muitos casos, além disso, as plantas apresentam um porte nitidamente reduzido, o que é consequência do enfezamento dos caules e dos brotos laterais. Um exame mais acurado de uma planta doente revela uma diminuição no tamanho das fôlhas, relacionada ás vezes com um ligeiro esclarecimento das nervuras. Também a côr verde do limbo das fôlhas é geralmente de uma tonalidade menos intensa que nas fôlhas de plantas sadias.

Ao arrancar-se uma planta doente, verifica-se que também o sistema radicular é grandemente prejudicado. Há formação de grande número de raizes filamentosas, que nunca chegam a atingir o comprimento nem a grossura das normais. Essa modificação patológica das raizes é justamente a causa principal do prejuizo consideravel que a doença acarreta, por serem as raizes a parte economicamente interessante da mandioca.

Para o estudo da transmissão experimental da doença empregamos os métodos usuais nas pesquisas de doenças de virus. Tentamos pois propagar a doença: 1) por multiplicação vegetativa de caules doentes; 2) por contáto entre plantas sadias e doentes; 3) por insétos vectores; 4) por suco; e finalmente, 5) por enxertia.

1) Multiplicação vegetativa de caules doentes (estaquia)

Iniciamos êstes estudos preparando, em 1942, uma série de estacas, a partir de ramas de plantas doentes procedentes de Lins e colhidas num mandiocal da variedade "vassourinha", fortemente atacado pelo "Superbrotamento".

Quarenta e quatro estacas de plantas tipicamente doentes foram plantadas em dois canteiros instalados em terrenos do Instituto Biológico (V. Clementino). Dêsse total, apenas 12 estacas deram origem a plantas, todas gravemente doentes. De 34 outras estacas preparadas de plantas aparentemente sadias, colhidas no mesmo mandiocal, e plantadas num canteiro ao lado, brotaram apenas 24 plantas, 22 das quais exibiram sintomas da doença.

Destas observações já podemos tirar alguns dados interessantes:

1) Estacas provenientes de plantas doentes dão, geralmente, origem a plantas doentes.

2) Uma grande porcentagem de estacas provenientes de caules doentes permanece no sólo sem formar novas plantas.

3) De estacas de plantas aparentemente sadias podem desenvolver-se, eventualmente, plantas doentes.

Aproveitamos as plantas doentes dêsses canteiros para executar, em 5-11-1942, alguns ensáios de transmissão da doença por aproximação íntima entre plantas sadias e doentes, num campo, conforme em seguida descrevemos.

2) Tentativas de transmissão da doença por mero contáto entre plantas sadias e doentes

Nas experiências de transmissão da doença por contáto, empregamos as plantas doentes nascidas das estacas plantadas nos canteiros de que trata o parágrafo anterior.

Em 5-11-1942 distribuimos nos canteiros 24 estacas sadias da variedade "vassourinha", de maneira que uma estaca sadia foi plantada o mais junto possivel de uma planta doente. Devemos ainda mencionar que as estacas sadias provieram de um mandiocal da visinhança de São Paulo (Tremembé, Cantareira), de uma zona onde ainda não se tinha verificado a ocorrência da doença.

Das estacas sadias desenvolveram-se plantas normais, sadias, que durante o período de observação, de 5-11-1942 á 1-8-1943, nenhum sintoma exibiram, de "Superbrotamento". Notou-se sempre um contraste muito nítido entre as plantas sadias, pouco ramificadas, de porte elevado, e as plantas doentes, pequenas e com um número excessivo de brotos. Essa diferença entre as plantas sadias e doentes pode ser observada na estampa 1, fig. *A*.

Nossas observações, feitas de 10 em 10 dias aproximadamente, e continuadas até o período de inverno, não confirmam a idéia da possibilidade de transmissão da doença pela mera aproximação.

3) Tentativas de transmissão da doença por meio de insetos

Não nos foi possivel, no curso dêsse trabalho, estudar detalhadamente o papel de todos os eventuais vectores da doença denominada "Superbrotamento". Efetuamos apenas uma série de observações com *Leptopharsa manihotae* Drake, *(Hemiptera-Tingitidae)*, porque notamos um ataque bastante forte dêsse inseto nas plantas dos nossos canteiros, no verão do ano de 1943. (1)

A-fim-de verificarmos uma possivel transmissão do "Superbrotamento", por meio dêsse inseto, procedemos da maneira seguinte: com um tubo coletor adequado apanhamos varios insétos nos estados de ninfa e adultos, os quais foram colocados sobre as fôlhas de uma planta que apresentava todos os sintomas típicos da doença. Ao lado dessa

(1) Devemos a determinação sistemática dêste inseto à gentileza do Dr. Oscar Monte, da Secção de Parasitologia Vegetal, do Instituto Biológico.

deixamos também duas plantas sadias. Todas essas plantas foram em seguida cobertas com um protetor revestido de tela de arame bem fino.

As observações efetuadas de 10 em 10 dias, a partir de 2-2-1943, tiveram um período de duração de 6 mêses. Durante todo êsse tempo as plantas sadias nenhum sintoma mostraram, de "Superbrotamento", tendo sofrido, porém, devido às condições desfavoraveis no interior da caixa, uma quéda das fôlhas. Essas experiências não conduziram, contudo, a nenhum resultado que nos levasse a crêr que o inséto *Leptopharsa manihotae* DRAKE fosse um vector da doença "Superbrotamento".

Também as nossas observações no campo, onde em muitos casos se encontravam plantas doentes, bem próximas de plantas sadias, não revelaram, pelo menos nas condições da Capital de São Paulo, casos de disseminação espontânea da doença. Por isso não estamos inclinados a admitir que nos nossos campos insétos vectores tivessem contribuido para a transmissão da doença.

4) TENTATIVAS DE TRANSMISSÃO DA DOENÇA POR MEIO DE SUCO

Realisamos cinco séries de ensáios para verificar a possibilidade da transmissão do "Superbrotamento" por meio de suco. Em todos êsses ensáios preparamos um suco de fôlhas doentes, depois de tritura-las num almofariz e passar a massa assim obtida, através de um pedaço de etamine. Os sucos empregados nas 5 séries de ensáios foram tratados por processos especiais, destinados a impedir a inativação do virus "in vitro".

Nas três primeiras séries acrescentamos ao suco já preparado algumas gotas de uma solução aquosa de sulfito de sódio a 0,5%. Seguimos nêste particular o método idealizado por BALD e SAMUEL (1, 1934) e usado para prolongar "in vitro" a atividade do virus da doença "Spotted-wilt" do tomateiro.

Na segunda série de ensáios efetuamos o preparo do suco em almofariz mergulhado numa cuba de gêlo. Nos ensáios da 3.ª série depositamos o suco, à medida que ia sendo obtido, numa caixa de Petri contendo um pouco de Nujol. Quizemos dessa maneira dificultar o acesso do oxigénio do ar ao suco e evitar assim a sua possivel oxidação. Ainda com o fim de garantir a atividade do virus "in vitro", durante o maior tempo possivel, preparamos na quarta série o suco com tampão de fosfato de sódio e não com água. Visavamos com essa medida manter o pH do suco durante a sua conservação no valor constante

de 7,1. Seguimos nêste método o processo descrito por Ross (21, 1941) em seus estudos sôbre a conservação "in vitro" do virus da alfafa.

As nossas 5 séries de ensáios de inoculação por suco distinguiram-se porém, não só pela maneira do preparo do suco, mas também pelo próprio modo da execução das inoculações. A inoculação da primeira série foi feita friccionando-se duas fôlhas de cada planta sadia com o suco preparado de fôlhas doentes. De acôrdo com o processo descrito por RAWLINS e TOMPKINS (20, 1936), as fôlhas a serem inoculadas tinham sido anteriormente polvilhadas com pó de carborundum, para facilitar a entrada das partículas do virus nas células. Na segunda série de ensáios colocamos gotas de suco considerado infeccioso, na axila de duas fôlhas das plantas experimentais, e perfuramos o pecíolo, através da gota, com um microalfinete esterilizado. Na terceira série seguimos o método de inoculação já empregado na primeira, trabalhando porem com um suco que tinha sido conservado na geladeira durante 24 horas. Também na quarta série a inoculação foi executada friccionando-se as fôlhas com o suco, cujo preparo porém, neste caso, tinha levado 30 horas. Escolhemos esta técnica mais demorada do preparo do suco a-fim-de possibilitar a maceração completa das células do inóculo e garantir o aproveitamento, no suco, do maior número possivel das partículas do virus. O método de inoculação adotado na quinta série, finalmente, constitue, em certo sentido, uma exceção, porque não trabalhamos então com suco propriamente dito. Para aproximar o mais possivel o método de transmissão mecânica, do processo de enxertia, colocamos, neste caso, uma fôlha doente, de cada vez, sôbre uma fôlha sadia, perfurando em seguida várias vezes as duas fôlhas sobrepostas, por meio de um microalfinete esterilizado.

As plantas usadas em todas estas experiências eram novas, e achavam-se em fase de pleno desenvolvimento. Elas pertenceram, nas primeiras duas séries de experiências, às variedades Guaxupé, Branca, Palma e Mata-Fome; o material da terceira série era composto de plantas das variedades Branca e Palma; e o da quarta série, de plantas das variedades Branca, Palma e Mata-Fome; finalmente os ensáios da última série foram executados apenas com plantas das variedades Branca e Guaxupé. Em algumas plantas inoculadas que faziam parte da primeira e da quarta série, observamos, alguns dias após a execução das inoculações, umas manchinhas cloróticas, especialmente nas fôlhas não inoculadas. Essas manchas, porém, não progrediram, como verificamos nas observações posteriores, de maneira que não acreditamos tenham elas qualquer relação com a doença em questão.

Tirando as conclusões das observações efetuadas em todas as plantas das cinco séries de inoculação mecânica, podemos dizer que em nenhum caso conseguimos uma transmissão da doença "Superbrotamento" da mandioca, por suco. E' porém mister afirmar que uma repetição dessas experiências, com material mais abundante, talvez desse resultado diferente. Em todo caso, não nos parece provavel que o agente causador de "Superbrotamento" da mandioca pertença ao grupo dos virus facilmente transmissiveis por suco.

Ante o resultado negativo das nossas tentativas de transmitir a doença em questão por mero contáto, por inséto, ou por meio de suco, achamos de grande importância verificar a possibilidade dessa transmissão por enxertia. Os ensáios realizados com esse fim são descritos em seguida.

5) Transmissão da doença por meio de enxertia

Nas tentativas de transmissão da doença "Superbrotamento" da mandioca por enxertia, fizemos uso de dois processos diferentes, conhecidos comumente por garfagem e encostia.

Quanto ao primeiro processo, foi aplicada a forma de garfagem lateral: no local da axila de uma fôlha executamos, no caule do cavalo, um córte oblíquo, conduzido até a medula, e enfiamos na fenda assim aberta a ponta do enxerto doente, cortada em bizel. Em seguida protegemos a zona da enxertia por meio de algumas voltas de ráfia.

Numa série ainda maior de experiências empregamos o método de encostia, do tipo descrito por HARLAND (11, 1927), sob o nome de "bottle grafting". Nêste processo retiramos um segmento de dois a três centímetros de extensão das zonas a serem encostadas, dos caules do enxerto e do cavalo. Em geral executamos as enxertias numa zona situada á altura de 4-5 cm a partir do cólo da planta sadia. Depois de encostar as duas superfícies lesadas e de proteger a zona de enxertia por meio de ráfia, enfiamos a parte basal livre do enxerto num tubo de ensáio contendo agua. Dessa maneira era evitado o excesso de transpiração da parte do enxêrto, nos primeiros dias após a execução da enxertia. Os dois tipos de enxertia por nós empregados acham-se respresentados na estampa 1, fig. *B*.

Uma precaução geral que foi tomada para proteger todas as plantas recem-enxertadas contra a influência prejudicial de perda dágua por transpiração, consistiu em conservar as plantas em caixas de iluminação reduzida e ventilação regulada. Essa maneira de conservação das plantas enxertadas ofereceu ainda a vantagem de as manter á prova de insétos. Precisamos evitar o acesso de insétos às

plantas a-fim-de excluir a possibilidade da contaminação acidental das plantas por qualquer virus, por eles transmissiveis.

Antes de apresentar em forma de tabelas os resultados das nossas experiências devemos ainda explicar alguns detalhes das nossas observações.

Usamos sempre, como cavalos, mudas novas em fase de pleno desenvolvimento e que tinham sido plantadas pouco antes em vasos com terra estercada. Essas mudas pertenciam a diversas variedades, como se pode ver nas tabelas.

Por outro lado, os enxêrtos, eram todos provenientes de plantas doentes da variedade "vassourinha", cultivadas nos canteiros descritos inicialmente.

Uma enxertia era por nós considerada pegada, quando quatro semanas após a execução da operação, ao retirar-se a ráfia, mostrava os dois componentes firmemente soldados.

Na tabela n.º 1 apresentamos os resultados de todos os ensáios de transmissão por enxertia, entre cavalos sadios e enxêrtos doentes, de mandioca, executados pelo método de garfagem. Já o exame rápido desta tabela mostra que a porcentagem, tanto de casos de pegamento como dos de transmissão da doença, foi reduzida. Em todo caso merece destaque o fato de que, num total de 2 casos, verificamos de maneira indubitavel a transmissão da doença, do enxêrto doente para o cavalo antes sadio. Êste resultado é especialmente interessante porque as nossas tentativas de transmissão mecânica da doença tinham falhado completamente.

TABELA 1

Enxertia de "garfo" de plantas doentes sôbre plantas sadias de mandioca

N.º da série	Data da enxertia	Variedade do cavalo	N.º de plantas enxertadas	N.º de enxêrtos pegados	N.º de casos de transmissão	"Período prepatente" em dias	Porcentagem de transmissão
1a	16-11-42	Branca	4	1	1	114	25%
3	4-12-42	Mata-fome	4	0	0	—	0%
4a	15-12-42	Vassourinha	8	1	1	120	12,5%
5	18-12-42	Branca	4	0	0	—	0%
6	23-12-42	Mata-fome	4	0	0	—	0%
7a	14-1-43	Branca	3	0	0	—	0%
7b	14-1-43	Mata-fome	4	0	0	—	0%
7c	14-1-43	Vassourinha	1	0	0	—	0%
8a	16-1-43	Mata-fome	1	0	0	—	0%
10a	19-4-43	Vassourinha	4	0	0	—	0%

Entrando agora na discussão de alguns detalhes dessa tabela, queremos, em primeiro lugar, tentar uma explicação para a baixa porcentagem de casos de transmissão da doença. Como se vê da tabela, existe uma correlação muito estreita entre o resultado de pegamento e o de transmissão. Tendo dado o método de garfagem, só em poucos casos, resultados satisfatórios, não é de estranhar que também os casos de transmissão da doença tenham sido diminutos. Pode-se inferir dessa correlação a idéia de que o agente causador do "Superbrotamento" pertença àquele grupo de doenças infecciosas, em que é necessaria uma ligação dos componentes sadio e doente, por células vivas, para garantir a transmissão.

Resta-nos agora expôr de que maneira se manifestaram os sintomas da doença no componente, antes sadio, da enxertia.

Como exemplo dum protocolo típico dos nossos ensáios daremos a seguir os resultados das observações relativas à única enxertia da série 1a de 16-11-1942 em que houve transmissão da doença:

Em 10-3-43, quer dizer, 114 dias após a execução da enxertia, notamos um ligeiro amarelecimento do limbo de algumas fôlhas e a formação de faixas estreitas de um verde escuro acompanhando as nervuras. Ao mesmo tempo verificamos, na axila de algumas das fôlhas do cavalo, por exemplo nas distantes 14 e 15 cm da zona de enxertia, o aparecimento de brotos novos com folhinhas mal formadas. A maioria dêsses brotos se desenvolvem na metade superior da haste principal do cavalo. Apesar de seu tamanho reduzido, já se nota neles a tendência de formar com a haste principal um ângulo bastante fechado. O broto maior mede aproximadamente 3 cm de comprimento. A planta, a que se refere esta descrição, acha-se representada na estampa 2.

Em 29-3-1943 observamos o aparecimento de pequenos ramos laterais (de 0,5 a 1 cm de comprimento) nos próprios brotos novos. O maior dêsses brotos alcança nesta data o tamanho de 4 cm aproximadamente. A haste do cavalo já começa a apresentar o aspecto de uma "vassoura de feiticeira". As fôlhas novas e médias do ápice do cavalo exibem manchas de um verde ligeiramente esmaecido, e nervuras levemente amarelecidas, contrastando com faixas escuras que acompanham essas nervuras.

Em 5-5-1943 chama a atenção a abundância de brotos novos, agora já de tamanho médio (até 5,5 cm), emitidos pela haste principal do cavalo, e desenvolvendo-se em direção quase paralela à haste principal. Êsses brotos originam-se dos nós muito aproximados uns dos outros, da metade superior do cavalo, cujos entre-nós estão encurtados. A zona da haste principal do cavalo (distante 10 cm da inserção do enxêrto) na qual se iniciou o desenvolvimento de novos brotos, mostra-se, numa extensão de cerca de 3 cm, nitidamente engrossada. Êsse engrossamento do caule se vê claramente nas figuras *C* e *D*, estampas 2-3.

Devemos referir-nos agora ao prazo necessário para a manifestação dos primeiros sintomas nos componentes, antes sadios, das enxertias, a que chamamos "período prepatente", no presente trabalho. Preferimos o emprego dêsse termo, sugerido por HOLMES (13,

1939 p.8) para poder reservar o conceito de "período de incubação" a casos em que a transmissão é efetuada por meio de insétos. Como se pode inferir da tabela, verificou-se nos dois únicos casos de transmissão da doença, um "período prepatente" de 114 e 120 dias. E' interessante notar que a diferença entre êsses dois valores é relativamente pequena, indicando que nas condições da nossa experimentação e fazendo uso do método de garfagem, o agente infeccioso do "Superbrotamento" da mandioca, leva cerca de 4 mêses para passar ao componente sadio da enxertia e provocar nele sintomas da doença.

Atribuindo o número reduzido de casos positivos de transmissão ao método de garfagem, empregado nos ensáios já resumidos na tabela 1, apresentaremos agora as experiências realizadas pelo processo de encostia. Os resultados de todos os ensáios nos quais fizemos uso deste último método acham-se condensados na tabela 2.

Já uma ligeira comparação entre os dados desta tabela e os da anterior mostra a maior eficiência do método de encostia para a transmissão da doença. De todos os ensáios realizados com êsse método, só a série 8b, executada em 16-1-1943, com cavalos da variedade Mata-fome, deu resultados negativos. Trata-se, nesta série, de casos de falta de pegamento entre os componentes da enxertia, devidos provavelmente a condições desfavoráveis da conservação das plantas enxertadas.

TABELA 2

Enxertia de "encostia" de plantas doentes sôbre plantas sadias de mandioca

N.º da série	Data da enxertia	Variedade do cavalo	N.º de plantas enxertadas	N.º de enxêrtos pegados	N.º de casos de transmissão	"Período prepatente" em dias	Porcentagem de transmissão
1b	16-11-42	Mata-fome	4	2	2	114 e 133	50%
2a	24-11-42	Branca	2	2	2	106 e 125	100%
2b	24-11-42	Mata-fome	2	1	1	106	50%
4b	15-12-42	Vassourinha	4	1	1	114	25%
8b	16-1-43	Mata-fome	12	0	0	—	0%
9	2-2-43	Vassourinha	12	7	7	117, 117, 119, 119, 119, 120 e 121	58,3%
10b	19-4-43	Vassourinha	11	9	9	95, 100, 100, 113, 113, 114, 114, 114 e 120	81,8%

Em todos os outros ensáios obtivemos resultados positivos de transmissão, às vezes numa porcentagem elevada. A êsse respeito

merecem destaque as séries n.º 9 e 10b, executadas com cavalos da variedade Vassourinha, nas quais uma transmissão da doença foi observada em 58,3% e 81,8% dos casos. Não podemos ainda dizer se o resultado satisfatório dessas séries pode ser atribuido a um gráo de suscetibilidade muito elevado dessa variedade ao agente infeccioso da doença ou se apenas a passagem dela, do enxêrto para o cavalo, foi facilitada por pertencerem os dois componentes da enxertia à mesma espécie. Em todo caso as duas séries mencionadas representam, com relação à transmissão da doença, os ensáios mais bem sucedidos dentre todos os por nós executados. Uma planta enxertada desta série é representada na figura *E* da estampa 3, que mostra o aspecto da planta 9 mêses após a execução da enxertia.

Assim como na explicação da tabela n.º 1, queremos também citar aqui uma parte do nosso protocólo para esclarecer a maneira como foram verificados, num caso típico, sucessivamente, os sintomas do "Superbrotamento" em um cavalo antes sadio. Escolhemos uma planta da série n.º 1b de 16-11-1942, composta de um cavalo sadio da variedade Mata-fome e de um enxêrto doente da variedade Vassourinha.

Nas observações que executamos em 20/7, 3/12, 7/12, 12/12, 14/12, 24/12/1942 e 8/1, 15/1, e 22/1/1943 não verificamos ainda sintomas do "Superbrotamento" no cavalo. Notamos porém, logo após a execução da enxertia, o bom pegamento dos componentes e um desenvolvimento favoravel do cavalo.

Em 10-3-1943, isto é, 114 dias após a execução da enxertia, observamos, na axila de uma fôlha inserida 14 cm acima da zona de enxertia e na axila de duas fôlhas mais novas, o aparecimento de 3 brotos novos, de um tamanho de 1 até 5 mm. Verificamos também, na mesma data, que as gemas dormentes na axila das fôlhas, na parte apical do cavalo, pareciam prestes a iniciar um desenvolvimento.

Em 29-3-1943 observamos um ligeiro engrossamento daquela parte da haste do cavalo, na qual se dava o desenvolvimento dos novos brotos. Os maiores dêsses brotos medem atualmente 2 a 2,5 cm. A figura *F* da estampa 4 mostra o aspecto da planta na referida data de observação.

Em 21-4-1943 achamos que o engrossamento de uma parte da haste do cavalo ficara mais acentuado pelo encurtamento dos entre-nós, que se faz sentir nitidamente nesta data. Algumas fôlhas do cavalo caracterizam-se pela côr do limbo verde esmaecido, que contrasta com o matiz verde escuro das faixas que acompanham as nervuras.

Em 18/5 e 7-6-1943 anotamos que o enxêrto se mantem ainda vivo e continua munido de fôlhas; quanto ao cavalo, verifica-se um aumento do número dos novos brotos. A direção de todos êsses brotos é quase paralela à da haste principal do cavalo, dando à planta o aspecto de uma "vassoura de feiticeira".

Em 10/7 e 9-8-1943 chama principalmente a nossa atenção o desenvolvimento defeituoso das novas fôlhas emitidas pelo cavalo. Algumas delas tem apenas três lobos, limbo amarelado e quebradiço, e apresentam faixas de verde escuro acompanhando as nervuras. Constatamos ainda que na face superior das fôlhas as nervuras são ligeiramente salientes.

Passando agora à considerar o tempo que nas experiências desta série, levou o agente infeccioso da doença "Superbrotamento" para provocar no cavalo, antes sadio, sintomas da doença, verificamos da nossa tabela que o menor valor do "período prepatente" foi constatado na série 10b de 19-4-1943. Nesta série observamos, em um caso já 95 dias após a execução da enxertia, o aparecimento dos primeiros sintomas da doença no cavalo. Aliás, pode-se inferir dos dados da nossa tabela que houve uma variação relativamente pequena entre todos os valores correspondentes ao "período prepatente" dos casos positivos de transmissão da doença. Em todas as enxertias observamos o sucesso da transmissão, dentro de um prazo de três até quatro mêses, após a execução da enxertia. Só em dois casos foi verificado um "período prepatente" um pouco mais longo. Se, apesar-do número reduzido de transmissões positivas obtidas com o método de garfagem, tentamos comparar os valores do "período prepatente" anotados nas tabelas 1 e 2, não podemos verificar a existência de uma diferença apreciavel entre os valores das duas tabelas. Parece, então, que no quarto mês, após a execução da enxertia, há a maior probabilidade de que se apresentem os primeiros sintomas da doença no componente, antes sadio, da enxertia. Êste resultado, conforme as nossas observações, é independente do método de enxertia empregado, e também da época do ano em que as enxertias foram executadas.

Os ensáios até agora referidos demonstraram de maneira indubitavel que a doença "Superbrotamento" da mandioca pode ser, por meio de enxertia, transmitida do componente doente para o sadio. A êste respetio há, pois, alguma analogia entre o comportamento desta doença e o modo de transmissão de certas doenças de virus. Poder-se-ia porém levantar contra a validade das conclusões referentes a uma tal analogia, diversas dúvidas. Uma delas poderia tomar como ponto de partida a falta de testemunhas nas séries até agora referidas, isto é, de enxertias entre componentes totalmente sadios. E' verdade que precisava ser demonstrado que sintomas do "Superbrotamento" não podem ser provocados, mesmo em plantas sadias, pelo próprio processo de enxertia. Outra dúvida que tinhamos ainda de esclarecer, relacionava-se com a possibilidade de estarem as plantas por nós usadas para as enxertias, contaminadas com fungos, com insétos ou com ácaros. Tal contaminação do nosso material experimental teria grande importância para a explicação das nossas observações, porque também êsses parasitas poderiam ser responsáveis por uma doença do tipo do "Superbrotamento". O resultado positivo de ensáios de transmissão por meio de enxertia não permitiria, nêste caso, nenhuma conclusão a res-

peito da natureza do agente causador da doença, porque qualquer um dos agentes possíveis poderia ser transmitido por meio de enxertia.

A série de ensáios cujos resultados apresentaremos na tabela 3, foi destinada a esclarecer, pelo menos em parte, êsses problemas. Usamos nesta série, como enxêrtos e cavalos, plantas que tinham sido conservadas durante mêses na estufa e que tinham recebido periodicamente um tratamento com inseticidas e fungicidas.

Êsse tratamento consistiu em fumigações semanais com sulfato de nicotina a 40%, em repetidos polvilhamentos de enxôfre, e em pulverisações periódicas com calda bordalêsa a 1%. Admitimos que mesmo êsse tratamento não garantiu, completamente, a eliminação de todos os acáros, insétos ou fungos que poderiam desempenhar um papel na transmissão do "Superbrotamento". Achamos porém que a contaminação das nossas plantas com êsses agentes foi grandemente diminuida devido ao nosso tratamento. Dessa maneira, teriamos que contar, nesta série de ensáios, pelo menos com uma grande demora na manifestação dos eventuais resultados positivos, se supuzermos uma participação de ácaros, insétos ou fungos no processo da transmissão.

Os resultados dêstes ensáios são apresentados na tabela 3.

TABELA 3

Enxertias entre componentes que tinham sido submetidos a um tratamento com inseticidas e fungicidas.

Enxêrtos provenientes de plantas doentes nas séries 13a e b, de plantas sadias nas séries 13c e d (testemunhas).

N.º da série	Data da enxertia	Tipo de enxertia	Variedade	N.º de plantas enxertadas	N.º de enxértos pegados	N.º de casos de transmissão	"Período prepatente" em dias	Porcentagem de transmissão
13a	18-5-943	garfo	Vassourinha	3	2	2	100 e 120	66,6%
13b	18-5-943	encosto	»	5	2	2	111 e 111	40%
13c	18-5-943	garfo testemunha	»	6	6	0	—	0%
13d	18-5-943	encosto testemunha	»	1	1	0	—	0%

Do exame dessa tabela podemos inferir, em primeiro lugar, que em enxertias compostas de plantas sadias, nunca se manifestaram sintomas do "Superbrotamento". Não pudemos observar nessas enxertias a menor anomalia, apesar de mantermos as plantas por mais de um ano em contínua observação.

Quanto ao segundo fim desta série de ensáios, isto é, a observação da transmisão da doença "Superbrotamento", mesmo em plantas

tratadas com inseticidas e fungicidas, vê-se das indicações da tabela 3, que a transmissão da doença não foi absolutamente impedida por êsse tratamento. Na série 13a, executada pelo método de garfagem, houve até uma porcentagem de transmissão de 66,6%, bastante elevada para um método de enxertia cujas dificuldades de sucesso foram antes expostas. Na série 13b a porcentagem de transmissão ficou abaixo dêsse valor, nivelando porem com os valores geralmente alcançados nos outros ensáios. Também o tempo que nos casos positivos das séries 13a e 13b o agente causador da doença levou para manifestar sintomas no componente, antes sadio, da enxertia, corresponde perfeitamente à média dos valores do "período prepatente" verificado nas outras séries. O tratamento das plantas com inseticidas e fungicidas não produziu pois impedimento ou retardamento nos ensáios de transmissão executados por meio de enxertia.

Após ter provado por todas essas séries de ensáios a possibilidade de transmitir por meio de enxertia, a doença "Superbrotamento" da mandioca, de enxêrtos doentes para cavalos sadios, tentamos esclarecer a questão de se também uma transmissão da doença no sentido inverso, isto é, de cavalos doentes para enxêrtos sadios podia ser demonstrada. Com êsse fim foram plantados, em vasos, alguns exemplares nitidamente doentes, de mandioca da variedade Vassourinha, que foram ligados, em 12-4-1943, por enxertia de encosto, com exemplares sadios da mesma variedade. Já o processo de enxertia nêstes casos ofereceu grandes dificuldades, devido ao fraco desenvolvimento da haste principal dos exemplares doentes. Também o pegamento dos componentes foi extremamente fraco, de maneira que não estranhamos o resultado completamente negativo dêsses ensáios de transmissão. Êsse insucesso é provavelmente devido mais às dificuldades da ligação orgânica entre um enxêrto bem desenvolvido e um cavalo fraco e deformado, do que à impossibilidade da passagem do agente causador de um para o outro componente.

Todos os ensáios até agora relatados se referem a experiências de transmissão da doença entre diferentes variedades de mandioca, isto é, entre representantes da espécie *Manihot utilissima* POHL. Quizemos verificar ainda, pelo menos por alguns ensáios, se por meio de enxertia pode a doença ser transmitida também a plantas sadias de maniçoba *(Manihot glaziovii* MÜLL. ARG.). Executamos essas experiências com mudas sadias de maniçoba recebidas em 23-3-1943, por gentileza do Snr. H. S. LEPAGE, Diretor da Divisão de Defesa Vegetal do nosso Instituto.

As experiências executadas com êsses exemplares acham-se resumidas na tabela 4.

Pela contínua observação das plantas enxertadas, verificamos que o pegamento nêstes casos de enxertia, nos quais os dois componentes pertencem a diferentes espécies, oferece mais dificuldades. De fato, pode-se inferir das indicações da tabela 4, que o número de casos positivos de pegamento entre os componentes da enxertia, nessas duas séries, foi bastante reduzido. Assim, merece ainda maior destaque o resultado positivo de transmissão, alcançado em dois casos da série 11

TABELA 4

Enxertias executadas pelo método de "encostia" entre plantas doentes de mandioca e plantas sadias de maniçoba.

N.º da série	Data da enxertia	Variedade do cavalo	N.º de plantas enxertadas	N.º de enxêrtos pegados	N.º de casos de transmissão	"Período prepatente" em dias	Porcentagem de transmissão
11	20-4-43	Maniçoba	7	2	2	243 e 271	28,5%
12	11-6-43	Maniçoba	5	1	1	169	20%

e em um caso da série 12. Para explicar melhor o tipo de sintomas apresentados por esta série de plantas, vamos comunicar aqui alguns detalhes do protocolo referentes ao único caso de transmissão positiva da doença verificado na série 12 de 11-6-1943.

Após ter-se anotado em 8-7-1943 e 12-8-1943 inteira falta de sintomas nas fôlhas do cavalo, antes sadio, registramos em 9-9-1943 a perda completa das fôlhas velhas por parte do cavalo de maniçoba e a ocorrência de grande número de botões no ápice da haste principal da planta.

Em 30-11-1943 já se tinham desenvolvido novas fôlhas no ápice do cavalo; essas fôlhas tinham uma côr bronzeada. Da axila de muitas delas sairam novos brotos. Em alguns casos verificamos o desenvolvimento de mais de um broto da mesma axila. Na zona do desenvolvimento principal dos novos brotos observa-se um encurtamento dos entre-nós.

Assim, os sintomas observados em maniçoba lembram bastante os que se manifestaram em plantas de mandioca, sendo porem menos convincentes, principalmente por causa da forma mais alargada do limbo das fôlhas de maniçoba. A fotografia (Estampa 4, fig. *G*), tirada em 8-1-1944, mostra o aspecto da planta a que se referem as descrições antes referidas.

Esclarecido, embora em ligeiros traços, o caráter de sintomas da doença "Superbrotamento", manifestados em plantas de maniçoba, devemos nos referir ainda ao tempo necessário, nestes casos de enxer-

tias heteroplásticas, para a transmissão da doença. Comparando os valores verificados, nesta série, para o "período prepatente", com as indicações correspondentes das séries anteriores, nota-se imediatamente que nas séries executadas com maniçoba os sintomas da doença só apareceram após um prazo mais longo. O menor valor do "período prepatente" observado nestas séries foi de 169 dias, superando já, consideravelmente, a média dos valores calculados para os ensáios anteriores. Nos outros dois casos de transmissão da doença de mandioca para maniçoba, verificamos até uma duração do "período prepatente" respectivamente de 8 e 9 mêses, período, pois, quase três vezes mais longo do que o usualmente observado nos casos de transmissão da doença entre componentes da mesma espécie.

Não podemos estranhar êsse resultado relativo a um período dilatado de transmissão, porque a passagem de agentes causadores de doenças, de um componente para o outro, efetua-se geralmente com maior dificuldade entre enxertias heteroplásticas do que em homoplásticas. Isso depende, provavelmente, da maior dificuldade que nos casos de enxertias heteroplásticas o agente causador encontra, para atravessar a camada de células que forma a barreira entre os dois componentes da enxertia. Naturalmente ainda existe, além disso, a possibilidade da espécie maniçoba apresentar maior resistência à doença "Superbrotamento", do que a mandioca.

DISCUSSÃO

Antes de nos manifestarmos sobre a nossa idéia relativa à natureza do agente causador da doença "Superbrotamento" da mandioca, queremos ainda descrever alguns fenômenos relacionados com o problema da transmissão da doença.

A primeira série de observações se refere à relação existente entre o vigor do enxêrto e a sua capacidade de transmissão da doença. Como regra geral pudemos verificar, das nossas experiências, que só enxêrtos que ficaram vivos durante muito tempo e continuaram munidos de fôlhas, serviram para transmitir a doença. Uma exceção dessa regra foi verificada com relação a um dos casos positivos de transmissão da doença do enxêrto de mandioca para o cavalo de maniçoba. No caso em questão o enxêrto morreu quatro mêses após a ligação dos componentes da enxertia. Mesmo assim, cerca de quatro mêses mais tarde, o cavalo começou a apresentar sintomas de "Superbrotamento". Talvez não seja por acaso que êsse exemplo se refere a uma enxertia heteroplástica. Sendo, neste caso de enxertias entre espécies diferentes, mais longo o "período prepatente" para a trans-

missão da doença, do que no caso de enxertias homoplásticas, um contacto relativamente prolongado entre enxêrto e cavalo, que mesmo assim não atinge a duração do "período prepatente", chega para possibilitar a passagem do agente infeccioso do "Superbrotamento", do enxêrto doente para o cavalo sadio. Em enxertias homoplásticas, essa mesma duração, isto é, um contacto de quatro mêses, já corresponderia ao prazo usual do "período prepatente". Queremos dizer com isso que efetivamente essa exceção vem confirmar a regra de que a transmissão da doença "Superbrotamento" só se realiza nos casos em que o enxêrto fica durante bastante tempo vivo e munido de fôlhas.

Também à outra série de observações que pretendemos expôr aqui, atribuimos certo valor elucidativo quanto à natureza do agente causador da doença "Superbrotamento". Entre os casos positivos de transmissão dessa doença, verificados na série 9 e anotados em nossa tabela 2, chamou nossa atenção uma planta, pela sequência não usual de sintomas que nela observamos: o cavalo originalmente sadio dessa enxertia começou a emitir, mais ou menos a partir do 6.º mês, após o processo da enxertia, fôlhas pequenas e amarelecidas, exibindo faixas escuras ao longo das nervuras. Notamos tambem um engrossamento da zona do caule na qual se dava a formação dessas fôlhas amarelas e na mesma zona um encurtamento dos entre-nós. Êsses sintomas eram também ainda visíveis numa observação realizada 4 mêses mais tarde. Nesta observação posterior, porem, constatamos que da zona apical da haste do cavalo tinham brotado fôlhas normais e que também os entre-nós na referida zona apresentaram o tamanho normal em plantas sadias. Quer-nos parecer por isso que se trata, nêste caso, de um restabelecimento *(recovery)* da planta, do ataque pelo "Superbrotamento". A planta tinha, primeiro, contraido a doença, sem reagir a ela continuamente por sintomas sistêmicos típicos. Casos semelhantes de "recovery" foram descritos na literatura com relação a muitas doenças de virus, especialmente à "ring-spot" do fumo e "curly top" da beterraba. Como exemplo de um trabalho referente a êsse fenômeno em plantas cultivadas no nosso Estado, queremos citar o trabalho de FORSTER (6, 1942) relativo à doença "vira-cabeça", de ocorrência frequente nas plantações de fumo.

Após o esclarecimento dêsses casos de transmissão da doença "Superbrotamento", algo diferentes dos outros, devemos manifestar ainda nossa opinião geral quanto à provavel natureza do seu agente causador.

Se considerarmos principalmente as manifestações sintomatológicas, o "Superbrotamento" da mandioca pertence, sem dúvida, ao

grupo de anomalias caracterizadas por brotação excessiva e denominadas entre nós, "vassouras de feiticeira" ("witch's broom" da literatura anglo-americana, "Hexenbesen" da alemã).

Devemos uma descrição bem elucidativa dos caracteres morfológicos dessas anomalias a v. TUBEUF (28, 1933). Segundo êste autor, parasitas fanerógamos, fungos, ácaros e fatores fisiológicos (principalmente virus) podem provocar a formação de tal anomalia.

Os tipos de "vassoura de feiticeira", ocasionados por êsses diversos agentes, são tão semelhantes entre si que o exame puramente morfológico não basta para diferenciá-los. De um exame mais acurado dos numerosos casos dessa anomalia até agora descritos, pode-se verificar que do ataque por p a r a s i t a s (de natureza organizada definida) resulta geralmente a formação de anomalias em zonas localizadas na planta hospedeira, ao passo que o efeito dos v i r u s — causadores de "vassouras de feiticeira" — é mais generalizado e se faz notar frequentemente em toda a extensão da planta infeccionada. Segundo êsse critério, deveriamos incluir a doença "Superbrotamento" da mandioca no grupo das doenças de virus.

Vamos ver agora, se as doenças do tipo de "vassoura de feiticeira" causadas por virus e observadas em plantas hospedeiras dos mais diversos grupos sistemáticos, têm, alem da distribuição generalizada dos sintomas sobre a planta inteira, ainda outros caracteres comuns. Não pretendemos aqui examinar detalhadamente todos os casos descritos na literatura de "vassoura de feiticeira", atribuidos à ação de virus, mas queremos aduzir, para a comparação com a doença por nós estudada, alguns casos típicos de "vassoura de feiticeira" ou de anomalias semelhantes, pesquisadas em *Solanum tuberosum* por YOUNG e MORRIS (29, 1928), em *Vaccinium macrocarpum* por BERGMAN e TRURAN (2, 1933), em *Robinia pseudacacia* por JACKSON e HARTLEY (14, 1933) e em *Ulmus americanus* por SWINGLE, TILFORD e IRISH (27, 1943).

Apesar-de abranger esta lista doenças encontradas em plantas das famílias mais diversas, não é difícil achar entre essas doenças certas analogias.

Todas as doenças que fazem parte dessa lista são de carater infeccioso, transmissíveis, porem, não por suco, mas por enxertia. O prazo que transcorre, da execução da enxertia até o momento da manifestação dos sintomas no componente antes sadio, é, no caso de todas essas doenças, relativamente longo, mas de duração bem definida. Os primeiros sintomas do "envassouramento" nem sempre se observam na vizinhança da zona da enxertia, mas às vezes em lugar bem distante dessa zona.

Voltando agora às nossas observações sobre a transmissão experimental da doença "Superbrotamento" da mandioca, vê-se logo que a maneira de transmissão da doença, por nós verificada, se adapta bem ao esquema antes exposto para as outras doenças. Só conseguimos a transmissão da doença por meio de enxertia e mesmo assim após um "período prepatente" relativamente longo. Por outro lado, êsse período teve uma duração comparativamente bem definida, compreendendo, nas enxertias homoplásticas, um prazo de cerca de 4 mêses, e nas enxertias heteroplásticas, um de 8 mêses, aproximadamente. Verificamos o aparecimento dos primeiros sintomas da doença geralmente em um nível da haste bastante distante da zona de enxertia. Nos dois casos citados mais detalhadamente no presente trabalho (veja por exemplo p. 8 e 10) foi averiguado o aparecimento dos primeiros sintomas da doença na haste do cavalo antes sadio à uma distância de 14 cm da zona da inserção do enxêrto. Finalmente, também a estreita relação existente entre a facilidade do pegamento dos componentes da enxertia e o sucesso da transmissão da doença é um fenômeno igualmente verificado nas doenças de virus acima enumeradas. (Veja por exemplo o trabalho de JACKSON e HARTLEY). A constância dessa correlação não seria bem compreensível, se considerassemos, por exemplo, ácaros, como agentes causadores da doença "Superbrotamento". Diante da verificação de todas essas analogias, que existem entre o "Superbrotamento" da mandioca e as doenças de virus, antes mencionadas como causadoras de "vassoura de feiticeira" em plantas de diversas famílias, achamos justificada a inclusão provisória da anomalia por nós pesquisada naquele grupo de doenças de virus.

É verdade que não executamos, no curso dêste trabalho, os ensáios micológicos e entomológicos necessários para provar esta hipótese. Podemos, porem, afirmar, sem embargo, que a maioria dos autores que descreveram as doenças de tipo de "vassoura de feiticeira" incluidas na nossa lista, não se apoiou em bases experimentais mais sólidas do que as nossas, para considerar os virus como responsáveis pelas respectivas doenças.

Nossa suposição, de ser um virus o agente causador da doença "Superbrotamento", baseia-se também em algumas indicações da literatura relativas a doenças de virus já estudadas em M a n d i o c a.

É verdade que nenhuma das doenças de virus até agora constatadas em *Manihot utilissima* foi jamais chamada "vassoura de feiticeira". Os tratados mais acatados de virologia, como os de KENNETH SMITH (23, 1937) e de HOLMES (13, 1939) mencionam apenas duas doenças de virus da mandioca, ambas chamadas "mosáico". Uma delas, causada (conforme SMITH) pelo *Manihot* virus 2, e caracteri-

zada por lesões necróticas ao longo do caule, tem, como parece, uma distribuição geográfica limitada e não é idêntica à doença por nós estudada. Menos facil, porem, é estabelecer a relação existente entre o "Superbrotamento" e o "Mosáico" da mandioca causada conforme SMITH, pelo *Manihot* virus 1. (DAMMER). A doença atribuida ao efeito deste virus tem uma vasta distribuição geográfica e encontra-se em quase todos os paises do mundo, produtores de mandioca. Existem na literatura referências à ocorrência do mosáico da mandioca em Nigéria, Libéria, Camerun, Congo Belga, território do Tanganyika, Madagascar, Java, e no Brasil.

Do estudo cuidadoso dessas referências da literatura pode-se inferir que o *Manihot* virus 1 não pode ser responsavel por todas as diversas doenças que lhe são atualmente atribuidas. Assim, queremos crêr que o virus causador da doença epidêmica, chamada "mosáico", em Camerun e Congo belga, e estudada principalmente por DUFRÉNOY e HÉDIN (5, 1929), HÉDIN (12, 1931), KUFFERATH e GHESQUIÈRE (15, 1932) e por LEFEVRE (16, 1934) não é idêntico ao *Manihot* virus 1 pesquisado por outros autores. Baseamos esta suposição no resultado indubitavelmente positivo que os mencionados pesquisadores tiveram nos ensáios de transmissão dessa doença por meio de suco. Não possuimos, infelizmente, descrições muito detalhadas da doença estudada pelos mencionados autores, parecendo porém que deformações e contorções do limbo e manchas cloróticas das fôlhas constituem os seus sintomas mais característicos. HÉDIN friza expressamente que não se observou nanismo nas plantas por êle examinadas. Talvez pertença ao mesmo grupo também o virus causador do "mosáico comum", observado no Brasil por COSTA (3, 1940). Pensamos assim porque esta doença também pôde ser transmitida facilmente a exemplares sadios de mandioca por meio de inoculações mecânicas.

Passaremos, com isso, à considerar os casos restantes de doenças de mandioca descritas na literatura com o nome "mosáico". Trata-se aproximadamente do mesmo grupo de doenças que HOLMES considera sendo causadas pelo cassava-mosaic virus, *Ruga Bemisiae*. Foi verificado que todas as doenças compreendidas nêsse grupo, não são transmissíveis por suco. Consegue-se porém a transmissão delas por meio de enxertia. Não há dúvida que apesar das restrições que fizemos, as doenças reunidas nêste grupo diferem ainda consideravelmente quanto ao tipo dos sintomas que lhes são peculiares: Isso se deve parcialmente à existência, verificada por STOREY (26, 1939), de numerosas variantes de *Manihot* virus 1, que se distinguem na gradação dos seus efeitos patológicos. Outra razão para a grande variação dos

sintomas do "mosáico da mandioca", observados por diversos autores, consiste nas diferenças na suscetibilidade das diversas variedades da mandioca a êsse virus. Compreendemos, assim, que não há completa concordância a respeito dos sintomas que em diversos paises e em diversas variedades de mandioca chamaram a atenção dos pesquisadores.

Numerosos autores consideram, por exemplo, o aparecimento de manchas cloróticas formando desenho de mosáico nas fôlhas como o sintoma mais característico da doença. Por isso o sintoma de "mosáico" teve lugar de destaque nas descrições de doenças da mandioca, efetuadas por Mc KINNEY (17, 1929) com relação à sua ocorrência na África Ocidental, por PASCALET (19, 1932) no Congo Belga, por STOREY e NICHOLS (24, 1938a) na África Oriental (i. e. no território de Tanganyica) e por SILBERSCHMIDT (22, 1938) e COSTA (3, 1940) no Brasil.

Mas já alguns dêsses autores esclarecem que em casos graves de doença as plantas de mandioca apresentam uma forte inibição no crescimento, tornando-se nitidamente enfezadas (por exemplo Mc KINNEY, PASCALET e STOREY). Parece porem que nas ocorrências desta doença na África, o sintoma de mosáico ainda persiste mesmo nos citados casos graves de doença. Já no tipo da doença observada em Java, por outro lado, há — conforme PASCALET (19, 1932) — pouca alteração da côr verde da folha.

Queremos dar em seguida uma descrição da doença "mosáico" da mandioca em Java, de acordo com as observações de MULLER, (18, 1931).

As fôlhas basais das plantas atacadas têm a aparência normal, porém as imediatamente acima delas apresentam uma tonalidade mais pálida, de verde ou de verde-amarelado. Esta alteração da côr pode às vezes interessar apenas um ou dois setores da fôlha.

Nas fôlhas superiores, as áreas doentes acham-se fortemente reduzidas no tamanho; às vezes o limbo fica limitado apenas a duas estreitas faixas que ladeiam a nervura principal. As fôlhas afetadas apresentam-se de vez em quando com encrespamento nítido e contorção. Nessas plantas os entre-nós são muito curtos, de maneira que a planta adquire um aspecto enfezado. Muito frequentemente a maioria das gemas dormentes do caule se desenvolve, dando origem, assim, a um número fóra do comum de ramos laterais.

Parece, ainda segundo a descrição de MULLER, que plantas cultivadas de sementes da variedade brasileira, citada nas referências de

literatura por nós consultadas como "Mangi", são particularmente suscetíveis ao "mosáico".

Comparando êstes sintomas do "mosaico", descritos por MULLER com os da doença "Superbrotamento" por nós estudada, não podemos fugir à impressão de que muito provavelmente as duas doenças são idênticas ou pelo menos, semelhantes embora de não exibirem as plantas "superbrotadas" as fortes deformações e reduções do limbo das fôlhas, verificadas por MULLER em exemplares "mosaicados". Trata-se, porem, nos dois casos, de doenças de virus não transmissíveis por suco, mas sim por enxertia, que causam uma forte redução no crescimento das plantas atacadas e provocam a quebra da dormência das gemas das hastes. Quadros sintomatológicos muito semelhantes aos descritos por MULLER e observados por nós, foram verificados ocasionalmente também em outros paises. Assim FRANÇOIS (7, 1937) que estudou a doença "mosáico" nas culturas de mandioca na ilha de Madagascar, descreve que as plantas por ela atacadas apresentaram, alem dos sintomas usuais, caules enfezados e providos de entre-nós extremamente encurtados. As fôlhas dessas plantas doentes apresentavam um limbo extremamente reduzido. Essa descrição ajusta-se também aos casos graves de ataque de plantas de mandioca pelo "mosáico", referidos por PASCALET.

Por êsse motivo somos levados à admitir que o "Superbrotamento" da mandioca é uma doença de virus, provavelmente já há anos pesquisada e observada na África e em Java. Não queremos dizer com isso, em absoluto, que todos os casos de "mosáico" da mandioca, já descritos na literatura, sejam idênticos ao "Superbrotamento". Pelo contrário achamos que plantas de mandioca atacadas pelo "mosáico" lembram os exemplares "superbrotados" apenas nos casos em que as tentativas de inoculação mecânica frustraram, e alem disso quando têm entre si grande semelhança de sintomas. É por isso que hesitamos em considerar extensivos ao "Superbrotamento" t o d o s os resultados de observações feitas sobre o "mosáico" da mandioca em África. Não podemos afirmar, por exemplo, que as valiosas pesquisas de GOLDING (8 e 9, 1935 e 1936) e de STOREY e NICHOLS (24, 1938 a) que resultaram na descoberta da transmissão do "mosáico" por meio de insétos vectores do gênero *Bemisia,* tenham sido efetuadas com uma variante do virus comparavel com o agente causador do "Superbrotamento". Em todo o caso, seria de bom alvitre estudar também em nosso meio a possibilidade da transmissão desta doença por insétos do mesmo gênero, estudos que podem adquirir grande importância prática.

Também outros resultados das experiências efetuadas na África e em Java com a doença "mosáico" da mandioca, fornecem-nos valioso

material complementar para as nossas observações sobre o "Superbrotamento".

Assim DEIGHTON (4, 1935) e STOREY e NICHOLS (24, 1938 a) referem-se a casos de aparente restabelecimento de plantas doentes, no campo. Trata-se provavelmente, nêstes casos, como no exemplo da planta "superbrotada" por nós estudada, de um "recovery" relativo, que se poderia transformar, com a mudança das condições externas, outra vez em doença pronunciada. PASCALET observou que estacas de plantas aparentemente sadias, mas provenientes de zonas infeccionadas com o "mosáico", deram origem a pés doentes. Tivemos também ocasião de verificar, como expuzemos à página 2, um comportamento idêntico com relação a estacas obtidas de plantas de mandioca aparentemente sadias, provenientes de Lins.

Não queremos nos estender demais na comparação dessas duas doenças, consideradas até agora diferentes. Esperamos, porem, que, uma vez provada a identidade entre a doença "Superbrotamento" e certas formas da doença "mosáico" já estudadas em outros paises, alguns resultados práticos lá conseguidos a respeito dos meios de combate, poderão ser aproveitados para a defesa contra o "Superbrotamento", que nos interessa particularmente. Observações promissôras, embora ainda preliminares, lá existem com relação à criação de variedades resistentes de mandioca (STOREY, 26 1939), à aplicação de certas práticas culturais para diminuir o efeito prejudicial da doença (STOREY e NICHOLS, 25, 1938b) e ao combate dos insétos que agem como vectores do virus. Convem que experiências semelhantes, planejadas entre nós, não sejam proteladas, porque o exemplo dos graves efeitos que a doença "mosáico" ocasionou na África nos mostra que um surto repentino e devastador do "Superbrotamento" no Brasil também não está absolutamente fóra das possibilidades.

STUDIES ABOUT THE "SUPERBROTAMENTO" OR "ENVASSOURAMENTO" OF CASSAVA

Abstract

1) The present paper is comprised of some experiments upon the experimental transmission of a disease of cassava (Manihot utilissima POHL), *named "Superbrotamento" or "Envassouramento", which was observed in Brazil for the first time in 1939.*

We performed these experiments with the purpose of contributing to a better understanding of the nature of the causal agent of this disease.

2) The symptoms of the disease consist principally of a severe stunting of the whole plant, of a shortening of the internodes and of the production of an extra number of side branches by the axillary buds. The leaf blade, the area of which is sometimes diminished, often shows a slightly chlorotic surface. (Plate 1, fig. "A", plate 2, pl. 3, and pl. 4, fig. "F").

3) Plants of cassava, originating from cuttings of diseased shoots, manifest clear symptoms of "Superbrotamento". Sometimes, we could observe those symptoms even in plants produced by cuttings, which were taken from healthy — looking specimens of Cassava, grown in fields contaminated with the disease.

4) We didn't succeed in obtaining transmission of the disease either by growing healthy plants in the direct neighbourhood of diseased ones or by sap inoculation.

5) We were successful, however, in transmitting the disease by grafting experiments using infected scions and healthy stocks of cassava. The graftings were executed by the method of side grafting and the process of "bottle-grafting", described by S. C. HARLAND *(11, 1927). Both of these methods gave positive results, which consisted in the appearance of symptoms of the "Superbrotamento" in the stock. For the "prepatent period" we observed a length of 3-4 months.*

6) The results of our experiments on the transmission of the "Superbrotamento" obtained in different stock-varieties of cassava, by means of the method of side-grafting are condensed in table 1 (p. 7), the results obtained by means of the method of bottle-grafting in table 2 (p. 9).

7) In table 3 (p. 12) we represent the results of similar graft-experiments, performed with plants, which had been periodically sprayed and dusted with fungicides and insecticides, during the months preceding the graft-process. We couldn't observe, in these experiments, any delay of the appearance of the first symptoms on the stock. Healthy check plants of cassava, grafted with healthy scions, never displayed the symptompattern of the "Superbrotamento".

8) Finally, we performed some graftings, composed of scions of diseased plants of Manihot utilissima and of healthy stocks of Ceará cassava, Manihot Glaziovii. Also in these experiments we could observe a transmission of the disease to the healthy component. The "prepatent period" in these experiments was at least twice as long as in the case of intraspecific graftings (Plate 4, fig. "G" and table 4, p. 14).

9) The results of all these experiments are in good accordance with the supposition, that a virus is the causal agent of the "Superbrotamento" of cassava.

We wish to stress, however, that it would be necessary, for the perfect identification of the causal agent, to complete our observations by mycological and entomological studies.

10) In the discussion we make a comparison between our findings and some references of the literature, relative to virus diseases of other plants. Founded upon this comparison we came to the conclusion, that the "Superbrotamento" of cassava may be included, save the eventually contradictory results of future observations in that group of virus diseases, which is characterized by the production of symptoms of "witch's broom".

11) By a further study of the literature referring to other virus diseases of cassava we learned, that the symptoms of the "Superbrotamento" agree rather well with those of some types of "cassava mosaic", caused by Manihot virus 1 and described, some years ago, by H. R. A. MULLER. *So we have reasons to consider the disease of cassava, named "Superbrotamento, identical with the cassava mosaic, observed in Java by the mentioned author or, at least, very similar to that disease. Concluding our discussion, we try to make a revision of all the diseases, comprised in the literature by the name "cassava-mosaic".*

BIBLIOGRAFIA

1 — BALD, J. G. and G. SAMUEL — 1934 — Some factors affecting the inactivation rate of virus of tomato spotted wilt. *Ann. appl. Biol.*, 21: 179-190.

2 — BERGMAN, H. F. and W. B. TRURAN — 1933 — An apparent case of transmission of Cranberry false blossom through a natural graft. *Phytopath.*, 23: 670-672.

3 — COSTA, A. S. — 1940 — Observações sôbre o mosáico comum e o mosáico das nervuras da mandioca (Manihot utilissima). *Jornal de Agronomia*, 3: 239-248.

4 — DEIGHTON, F. C. — 1935 — Ann. Rept. Agric. Dept. Sierra Leone for the Year 1933, 14-20, referido em *Rev. appl. Myc.* 14: 427-428.

5 — DUFRÉNOY, J. et L. HÉDIN — 1929 — La mosaïque des feuilles du manioc au Cameroun. *Rev. Bot. Ap. et Agr. Trop.*, 9: 361-365.

6 — FORSTER, R. — 1942 — Restabelecimento ("recovery") em plantas de fumo atacadas pelo virus de "vira-cabeça". *Bragantia*, 2: 499-514.

7 — FRANÇOIS E. — 1937 — Un grave péril. La mosaïque du Manioc. *Agron. colon.* 26: 33-38, referido em *Rev. appl. Myc.*, 17: 94, 1938.

8 — GOLDING, F. D. — 1935 — A probable vector of Cassava mosaic in Southern Nigeria. *Trop. Agric., Trin.*, 12: 215, referido em *Rev. appl. Myc.*, 15: 72, 1936.

9 — Golding, F. D. — 1936 — Bemisia nigeriensis Corb., a vector of Cassava mosaic in Southern Nigeria. *Trop. Agric., Trin.*, 13: 182-186, referido *Rev. appl. Myc.*, 16: 16, 1937.

10 — Gonçalves, R. D., E. S. Normanha e O. J. Boock — 1942 — O "superbrotamento" ou "envassouramento" da mandioca. *Secretaria da Agricultura, Indústria e Comércio do Estado de São Paulo.*

11 — Harland, S. C. — 1927 — A note on the vegetative propagation of cotton plants. *Trop. Agriculture*, 4: 96.

12 — Hédin, L. — 1931 — Culture du manioc en Côte d'Ivoire, observations complémentaires sur la mosaïque. *Rev. Bot. Appl. et Agr. Trop.*, 11: 558.

13 — Holmes, F. C. — 1939 — *Handbook of phytopathogenic viruses.* Burgess Publishing Company Minneapolis, Minn.

14 — Jackson, L. W. and C. Hartley — 1933 — Transmissibility of the brooming disease of black locust. *Phytopath.*, 23: 83-90.

15 — Kufferath, H. et J. Ghesquière — 1932 — La mosaïque du Manioc. *C. R. Société de Biologie*, 109: 1146-1148.

16 — Lefevre, P. — 1934 — Quelques considerations sur la "mosaïque do Manioc". *Bull. agric. Congo belge*, 26: 442-447, referido em *Rev. appl. Myc.*, 15, 342, 1936.

17 — Mc Kinney, H. H. — 1929 — Mosaic diseases in the Canary Islands, West Africa and Gibraltar. *Journ. Agric. Res.*, 39: 557-578.

18 — Muller, H. R. A. — 1931 — Mozaiekziekte bij Cassave. Inst. voor Plantenziekten, *Bull* 24, 17 pag.

19 — Pascalet, M. — 1932 — La mosaïque ou lèpre du manioc. *Agron. Colon.*, 21: 117-131, referido em *Rev. appl. Myc.*, 11: 761.

20 — Rawlins T. E. and C. M. Tompkins — 1936 — Studies on the effect of carborundum as an abrasive in plant virus inoculations. *Phytopath.*, 26: 578-587.

21 — Ross, A. F. — 1941 — Purification and properties of alfalfa-mosaic-virus protein. *Phytopath.*, 31: 399-410.

22 — Silberschmidt, K. — 1938 — O mosaico da Mandioca. *O Biologico*, S. Paulo, 4: 177-181.

23 — Smith, K. M. — 1937 — *A textbook of plant virus diseases.* London, J. and A. Churchill Ltd.

24 — Storey, H. H. and R. F. W. Nichols — 1938a — Studies of the mosaic diseases of cassava. *Ann. appl. Biol.*, 25: 790-806.

25 — Storey, H. H. and R. F. W. Nichols — 1938b — A field experiment in the transmission of Cassava Mosaic. *East Afr. Agric. Journal of Kenya, Tanganyika, Uganda and Zanzibar*, 3: 446-449.

26 — Storey, H. H. — 1939 — Rep. East-Africa agric. Res. Stat. 8-11, referido em *Rev. appl. Myc.*, 20: 102, 1941.

27 — Swingle, R. U., P. E. Tilford and C. F. Irish — 1943 — A graft transmissible mosaic of american elm. *Phytopath.*, 33: 1196-1200.

28 — Tubeuf, C. v. — 1933 — Das Problem der Hexenbesen, *Zeitschr. f. Pflanzenkrht.*, 43: 199-242.

29 — Young, P. A. and H. E. Morris — 1928 — Witch's broom of potatoes and tomatoes. *J. Agric. Res.*, 36: 835-854.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Estampa 1

Fig. *A* — Uma planta sadia de mandioca da variedade Vassourinha, ladeada por duas plantas atacadas por "Superbrotamento". (Fot. 18-12-1942).

Fig. *B* — Enxêrtos "superbrotados" de mandioca da variedade Vassourinha em cavalos sadios da variedade Branca e Mata-fome. O método empregado para as enxertias é o de garfagem (planta à direita) e o de encostia (plantas dos dois vasos à esquerda). Enxertia em 16-11-42, fot. em 18-12-1942).

Estampa 2

Fig. *C* — Sintomas da doença, apresentados por uma planta de mandioca da var. Branca, enxertada com um garfo "superbrotado" da var. Vassourinha. (Enxertia em 16-11-1942, fot. em 29-3-1943).

Estampa 3

Fig. *D* — Topo da haste principal de uma planta de mandioca mostrando a região da haste que ficou engrossada por efeito da doença "Superbrotamento", (Enxertia em 2-2-1943, fot. em 8-6-1943).

Fig. *E* — Sintomas apresentados por uma planta de mandioca da variedade Vassourinha enxertada 9 mêses antes, de encosto, com haste de planta "superbrotada", da mesma variedade. (Enxertia em 19-4-1943, fot. em 8-1-1944).

Estampa 4

Fig. *F* — Planta de mandioca da variedade Mata-fome, enxertada de encosto com haste de mandioca Vassourinha com "Superbrotamento". (Enxertia em 16-11-1942, fot. em 29-3-1943).

Fig. *G* — Planta de maniçoba enxertada de encosto com haste de mandioca Vassourinha "superbrotada". (Enxertia em 11-6-1943, fot. em 8-1-1944).

(Fotos *C-G*, B. Mazza)

A

B

G

F

Vol. 15 — Art. 2 Agosto de 1944

AÇÃO BACTERIOSTÁTICA DE UM COGUMELO MACROSCÓPICO PERTENCENTE À FAMILIA DAS PORIPORACEAS "POLYPORUS CINNABARINUS (JACQ.) FRIES."

POR

J. R. Meyer

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com o interesse despertado pela penicilina nestes últimos anos, diversos têm sido os vegetais em que se verificou a presença de substâncias antibacterianas.

Em trabalho recente OSBORNE (8) refere-se a nada menos que 63 gêneros de plantas superiores dotadas de princípios ativos capazes de impedir até certo ponto o desenvolvimento de bactérias.

Mais diretamente ligadas à descoberta da penicilina no *Penicillium notatum* (5) há outras observações interessantes a respeito de plantas inferiores, todas microscópicas, de que foi possível separar uma ou mais substâncias antagônicas a germens patogênicos. Assim, de um germen esporulado e aeróbio próprio do solo, conseguiu DUBOS (2 e 3) isolar uma substância dotada de ação contra bactérias, sobretudo gram-positivas. Em estudos posteriores DUBOS e HOTCHKISS (4) identificaram esse germen como sendo o *Bacillus brevis*, e ao seu princípio ativo deram o nome de "gramicidina".

Empregando a mesma técnica, conseguiram, além da gramicidina e com o *Tyrothrix scaber*, outra substância menos ativa que a gramicidina se diferenciando daquela por ter poder bactericida. A esta última denominaram "tirotricina". Além da diferença apontada, a tirotricina se distingue da gramicidina por demonstrar atividade *in vitro*, tanto sôbre germens gram-positivos como sôbre gram-negativos.

Por sua vez WAKSMAN e WOODRUFF (11), estudando microorganismos do sólo e especialmente *Pseudomonas aeruginosa* e um *Actinomyces*, conseguiram uma substância altamente termoestavel e capaz de inibir nos meios de cultura o crescimento tanto da *Escherichia coli* como da *Brucella abortus*. Mais tarde (12) verificaram que a atividade bacteriotrópica do actinomices cromogeno que estudaram é devida a duas substâncias, às quais deram o nome de "actinomicina A" e "actinomicina B". A primeira é vermelha, soluvel no alcool etílico, no eter, na água e insoluvel no eter de petróleo. Na água o princípio ativo citado tem coloração clara. A actinomicina B só é soluvel no eter e

no eter de petróleo e dificilmente soluvel na água ou no alcool etílico. A actinomicina A é fortemente bacteriostática contra germens gram-positivos e pouco ativa contra os gram-negativos. A actinomicina B é apenas ligeiramente bacteriostática e mais ativa como bactericida.

Em 1942 os mesmos autores estudaram (13) outro cogumelo, denominado *Actinomyces lavandulae,* com o qual produziram um novo princípio ativo, diferente dos demais por atuar principalmente sôbre bactérias gram-negativas e ao qual denominaram "estreptotricina", por ser o actinomices do qual fôra isolado conhecido anteriormente como pertencente ao gênero *Streptothrix.* Ainda num estudo sistemático sôbre presença de substâncias antagônicas a bacterias, WAKSMAN, HORNING e SPENCER (14) isolaram mais duas substâncias antibacterianas, uma das quais, a "fumigacina", cristalisavel e isolada do *Aspergillus fumigatus,* tem maior ação sôbre germens gram-positivos, e outra, a "clavacina", ainda não cristalisada e obtida do *Aspergillus clavatus.* Esta, além de ser bactericida, tem atividade muito grande contra bactérias gram-negativas.

Em estudos posteriores WAKSMAN (15) refere que ambas as substâncias foram purificadas, tendo sido conseguida a cristalização da clavacina e sua identificação com a substância anteriormente isolada do *Penicillium patulum* e denominada "patulina". Nesse mesmo trabalho se faz menção da "citrinina" produzida pelo *Penicillium citrinum* e pelo *Aspergillus candidus,* à "glioxina" produzida pelo *Trichoderma* e *Gliocladium* e à "spinulosina", produzida pelo *Penicillium spinulosum* e *A. fumigatus.*

Como se vê, todos os trabalhos referidos, tratam de substâncias anti-bacterianas existentes, ou em plantas superiores ou em cogumelos microscópicos. Tanto quanto nos foi possivel constatar na literatura a nosso alcance, até o presente nenhuma notícia existe a respeito de cogumelos macroscópicos produtores de substâncias antibacterianas.

Foi o que conseguimos verificar em ensáios a este respeito e com as frutificações de um representante da familia das poriporáceas.

O cogumelo em questão, classificado gentilmente pelo Dr. Alcides Ribeiro Teixeira, do Instituto Agronômico de Campinas, é o *Polyporus cinnabarinus.* Êsse cogumelo vegeta sôbre madeiras, troncos ou galhos de arvores em decomposição em lugares quentes e húmidos. E' relativamente comum no Estado de S. Paulo, onde é vulgarmente conhecido pelo nome de "orelha de pau vermelha". Nas fórmas precoces de sua evolução é formado por um micelio denso e perfeitamente branco, que encontrando condições favoraveis frutifica, emitindo espansões de côr vermelha, egual à do zarcão. As frutificações desse

cogumelo teem a fórma de uma orelha humana, donde o seu nome. Prendem-se aos pontos onde crescem, por uma base sessil ou pediculada e variam de tamanho de acordo com a fase de crescimento. No litoral do Estado o seu maior tamanho é verificado nos mêses mais quentes do ano, quando as espansões referidas chegam a atingir até 6 ou 7 cm de diâmetro. Colocando-se fragmentos de *Polyporus cinnabarinus* desenvolvido em meios inoculados com *Staphilococcus* ou *Streptococcus* ou *Pasteurella avicida*, seja em tubos de caldo ou em placas de agar, nota-se que dentro de 12 a 18 horas os germens deixam de se desenvolver. Esse fato se torna evidente pela falta de turvação do meio, quando se empregam tubos, ou pelo aparecimento de um hálo transparente ao redor dos pedaços de cogumelo, quando a prova é feita em placas de agar. Os extratos aquosos dos tecidos citados, feitos a frio, com 1 parte dos frutos de *P. cinnabarinus* em 10 partes de água ou solução salina, demonstram a mesma atividade em grau variavel, conforme as diluições subsequentes. O mesmo efeito bacteriostático não se manifesta sôbre *Escherichia coli* nem sôbre *Salmonella typhimurium*. O extrato aquoso resistiu relativamente bem à fervura prolongada, e mesmo depois de esterilizado em autoclave ou quando deixado a temperatura ambiente durante vários mêses manteve suas propriedades anti-bacterianas. Injetado em animais de laboratório, por diferentes vias, esse extrato não produz perturbações aparentes nem revela sinais de toxidês. Em nota preliminar sôbre o assunto, tivemos ocasião de registrar outros detalhes a este respeito (7).

Tratando-se de um material novo, e havendo todo o interesse em conhecer quais as condições ótimas para verificação da atividade bacteriostática citada, nossa intensão no trabalho presente é relatar diversas séries de experiências em que foi verificada a importância de um certo número de fatores, sôbre os resultados.

Entre os fatos tomados em consideração e por se tratar de provas semelhantes, figuram os que, segundo FOSTER (6), RAMMELKAMPF (9), ABRAHAM, CHAIN e outros (1) devem constituir objeto de atenção em provas bacteriostáticas congêneres.

Método de Prova — Por serem perfeitamente dignos de confiança os resultados conseguidos com o método da prova em depressões feitas no agar *(cup plate method)*, segundo os últimos autores citados, e por não nos ser possivel conseguir os cilindros de fundo liso e lapidados, da técnica recomendada por SCHMIDT e MOYER (10), deixamos de adotar esta modalidade do processo, tendo em vista, como fazem estes autores para a execução da prova bacteriostática da penicilina, outros detalhes de grande importância, tais como a unifor-

midade de composição do meio em que se fazem as provas, a espessura da camada de agar inoculado, a maneira de fazer a semeadura das placas, a concentração dos inóculos, o pH do meio em que se fazem as semeaduras e o gráu de difusão do princípio ativo. Como dissemos, em vez dos cilíndros sem fundo para a contensão do material a provar, usamos sempre o método das depressões, e um meio sólido constituido por uma mistura de água de carne, 2 % de agar, 1 % de peptona e 0,5% de NaCl, tudo ajustado a um pH egual a 7,2.

Uma das modalidades de semeadura em placas consiste em tomar uma grande quantidade de germens empastados ou uma gota de emulsão espessa de germens e espalha-los sôbre toda a superfície do agar com um rodo horizontal feito na extremidade de uma pipeta estirada. Esse processo não é recomendavel, porquanto por mais cuidado que se tenha, desse modo a distribuição dos germens é pouco uniforme. Em consequência disso, quando se lêem os resultados, vem-se áreas de crescimento intenso ao lado de áreas em que o crescimento dos germens é muito menor.

Experiências relativas à quantidade de germens usados na prova. — Uma vez considerados esses fatos e escolhido o método de semeadura, que consiste em derramar na placa uma suspensão de bactérias, tratamos em primeiro lugar de estabelecer qual a melhor quantidade de germens *(Staphylococcus* ou *Streptococcus)* a semear. As suspensões espessas podem, depois de espalhadas absorver a totalidade do princípio bacteriostático, não ficando livre quantidade suficiente para manifestar os efeitos antibacterianos. As suspensões muito diluidas, por sua vez, depois de semeadas dão colonias raras e esparsas com grandes espaços claros, passiveis de confusão com o hálo de bacteriostáse. Na seguinte experiência, feita com extrato aquoso de *Polyporus* a 1 por 10 e com suspensões bacterianas de diversos títulos verifica-se a importância das quantidades de germens usadas para a prova. A suspensão mais espessa empregada consistiu numa emulsão de uma cultura de *Staphylococcus aureus*, semeada 24 horas antes sôbre agar simples inclinado num tubo de 180 × 18 mm. Todo o enduto bacteriano foi emulsionado em 10 cc de solução fisiológica. A emulsão, depois de semeada em placas, forneceu material para novas diluições, como se vê no quadro abaixo. As semeaduras foram feitas derramando cerca de 2 a 3 ml das suspensões em cada placa de agar, espalhando-se o líquido sôbre toda a superfície e retirando por aspiração o excesso do líquido espalhado e absorvendo a parte líquida que fica na margem do agar, com papel absorvente ou gaze hidrófila. Depois, praticando o método do "cup plate" com um tubo de vidro e por aspiração, retiravam-se do agar semeado pequenos discos de 5 mm de diâmetro. Com isso obtinham-se pequenas depressões de 5 mm de diâmetro e de 3 mm a 5 mm de profundidade, conforme a altura da camada do agar. Em seguida essas depressões eram enchidas até o nivel ou quase até o nivel superior, com o líquido a provar, tendo-se o cuidado de evitar que êle se espalhasse sôbre a superfície adjacente às bordas da depressão. Nessas condições as placas eram levadas, uma hora mais tarde, a uma estufa a 37° C e os resultados lidos de 12 a 15 horas mais tarde. O seguinte quadro resume os fatos principais desta experiência.

QUADRO N.º 1

Importância da diluição das suspensões de bactérias para a verificação da ação bacteriostática do *Polyporus cinnabarinus*

Placas	Tipo da suspensão de *Staphylococcus*	Diâmetro dos hálos de bacteriostase em mm	Espessura do agar em mm
N.º 1	Cultura de 24 hrs. em 10 ml sol. fisiol.	11	3
N.º 2	8 gotas da susp. 1 em 10 ml sol. fisiol.	13	3
N.º 3	4 gotas da susp. 1 em 10 ml sol. fisiol.	11 (!)	5 (!)
N.º 4	2 gotas da susp. 1 em 10 ml sol. fisiol.	15	3
N.º 5	1 gota da susp. 1 em 10 ml sol. fisiol.	17	3
N.º 6	1 gota da susp. 1 em 20 ml sol. fisiol.	Colonias muito esparsas	3

Como se vê pelo quadro, o diâmetro do hálo varia de acordo com a diluição da suspensão bacteriana. Quanto mais espéssa fôr a suspensão ou emulsão de bactérias menor será o diâmetro de bacteriostáse.

Experiências relativas à altura da camada de agar semeada — Outro fator que poderia ter importância na intensidade dos resultados é a altura da camada do agar. Tendo em vista o resultado contraditório da placa n.º 3, registrado no quadro n.º 1 (onde o hálo de bacteriostáse menor, apesar da diluição, coincidia com uma camada mais alta de agar), foi considerada a hipótese de que a maior espessura do agar prejudicasse a difusão do princípio ativo, que no caso não enchia completamente a depressão feita para receber o líquido a ser provado. A hipótese aventada constituiu o objeto da seguinte experiência, em que uma determinada emulsão devidamente diluida foi espalhada em cinco placas

QUADRO N.º 2

Mostrando a importância da altura da camada de agar, na prova da ação bacteriostática do *Polyporus cinnabarinus*

Placas	Altura da camada de agar em mm	Enchimento das depressões com o extrato de *Polyporus*	Diâmetro dos hálos de bacteriostáse em mm
N.º 1	3	2 depressões compl. cheias	21
		2 depressões compl. cheias	21
N.º 2	4	2 depressões quase cheias	15
		2 depressões quase cheias	15
N.º 3	5	2 depressões cheias	15
		2 depressões pela metade	11
N.º 4	6	2 depressões cheias	15
		2 depressões tendo cerca 1/3 de líquido	9
N.º 5	7	2 depressões cheias	15
		2 depressões tendo pouco líquido no fundo	hálos praticamente nulos

de agar cujas alturas variavam entre 3 e 7 mm. Em cada uma dessas placas foram praticadas quatro depressões de 5 mm de diâmetro. Duas dessas eram completamente enchidas com o líquido a provar, de modo que êle alcançasse a superfície superior da depressão sem se espalhar pelas partes visinhas. Quasi todas as outras duas depressões recebiam sempe menor quantidade do extrato de *Polyporus*, na dose de 3 gotas, feitas com uma mesma pipeta estirada, tendo na ponta uma abertura de 1 mm de diâmetro. As leituras feitas com 15 horas de incubação a 37° C forneceram os resultados registrados no quadro n.° 2.

Os dados coligidos na experiência citada mostram que a altura da camada de agar deve ser tomada em consideração na prova de bacteriostáse de *Polyporus cinnabarinus* e que os hálos maiores se obtem quando a prova é feita em placas tendo uma camada de agar de 3 mm de espessura, e as depressões são completamente cheias com o líquido a provar. A experiência repetida outras vezes confirmou essas observações.

Experiências relativas ao transbordamento do líquido a provar na superfície semeada — Como no tipo da experiência anterior, tinhamos a princípio, dificuldade em encher as depressões feitas no agar sem que uma pequena quantidade do extrato transvasasse, e isso pudesse explicar a existência de hálos maiores de bacteriostáse em consequência do transbordamento do líquido, foi feito o ensáio seguinte:

Quatro caixas de Petri com uma camada de agar de 3 mm de altura foram semeadas com uma suspensão de *Staphylococcus*. Após a semeadura essas placas receberam respectivamente, na superfície, sem que fosse praticada nenhuma depressão, uma, duas, três e quatro gotas de um extrato de *P. cinnabarinus* de atividade conhecida. Com as gotas mais ou menos espalhadas sôbre a superfície do agar semeado, as caixas de Petri foram levadas a estufa e os resultados, lidos 12 horas mais tarde, foram os seguintes:

QUADRO N.° 3

Inatividade da ação bacteriostática do extrato aquoso quando apenas deixado em lençol fino na superfície do agar semeado com *Staphylococcus*

Placas	N.° de gotas do extrato ativo colocadas sôbre a superfície semeada do agar	Sinais visiveis de bacteriostáse
N.° 1	1	Nulos
N.° 2	2	»
N.° 3	3	»
N.° 4	4	»

Esta observação indica que os hálos de bacteriostáse que se observam mesmo quando ha um transvasamento do extrato ativo para fóra das depressões feitas no agar, não são devidos ao transbordamento do líquido na superfície semeada, mas às substâncias existentes em maior quantidade no líquido posto nos receptáculos de onde aos poucos

os princípios ativos se vão difundindo para impedir o crescimento das bactérias que entram em contacto prolongado com eles.

A experiência acima referida parece interessante porque mostra a coincidencia entre a maior intensidade da ação bacteriostática e a pequenez da área ocupada pelo líquido ativo. Por outras palavras, quanto maior a altura da camada de líquido a provar, tanto maior será o hálo de bacteriostáse. Esta coincidencia possivelmente é devida à alteração dos princípios ativos pela oxidação favorecida com o espalhamento do líquido em superfícies maiores ou mesmo pela destruição dos princípios ativos postos em contacto com um número muito maior de germens quando o líquido, em camada fina, fica mais espalhado.

Importância do pH na prova de bacteriostáse — Como os extratos recentes de *Polyporus* apresentassem um pH um pouco mais baixo (6,5) que os extratos mais antigos e guardados durante mêses em recipientes de vidro e isso coincidisse com uma ligeira perda da atividade, realizamos diversos ensaios tendo em vista esses fatos e em que se confirmou a hipótese de que a atividade do princípio bacteriostático fosse favorecida por um pH ligeiramente ácido.

Nessas provas faziamos suspensões em solução salina tendo o pH variavel entre 6 e 8. Essas suspensões eram semeadas e a prova feita com extratos aquosos de *Polyporus* tendo o pH tambem variavel entre 6 e 8,5. Os resultados dessas experiências foram os seguintes:

QUADRO N.º 4

Influência do pH sôbre a atividade bacteriostática dos extratos aquosos de *Polyporus cinnabarinus*

Placas	pH da suspensão do *Staphylococcus* e do extrato de *P. cinnabarinus*	Diâmetro dos hálos de bacteriostáse
N.º 1	6 — 6,5	2 — 2,2 cm
N.º 2	7 — 7,5	1,5 — 1,8 cm
N.º 3	8 — 8,5	1 — 1,4 cm

Os resultados acima obtidos evidenciam que uma ligeira acidez favorece a ação bacteriostática estudada.

Um elemento de grande importância que deve ser considerado nas experiências com o *P. cinnabarinus* é o momento em que se deve fazer o exame das placas, depois de incubação. Placas de prova tendo excelentes hálos de bacteriostáse ao cabo de 15 horas, se forem deixadas na estufa, ao cabo de 24 ou 48 horas mostrarão que os diâmetros desses hálos aos poucos se vão tornando menores até desaparecerem de todo, por serem gradualmente invadidos pelas bactérias que começam a crescer da periferia para o centro e que acabarão por ocupar toda a primitiva área de bacteriostáse.

Esse fenómeno parece coincidir com uma destruição dos princípios ativos que ficam em contacto com as bactérias. A mesma destruição póde ser demonstrada quando se colocam pequenas dóses de princípio ativo em tubos de caldo semeados com germens sensiveis. Enquanto nas primeiras 12 horas esses tubos permanecem perfeitamente límpidos, ao cabo de 24 ou 36 horas já se começa a notar ligeira turvação consequente ao crescimento dos germens. Esse fato coincide com a mudança da côr do meio líquido semeado, que em vez de amarelo se torna castanho.

As diferentes séries de experiências que acabam de ser registradas, permitindo conhecer as melhores condições para manifestação da atividade, resultaram no estabelecimento de certo numero de condições que devem ser preenchidas ao se fazer a prova de bacteriostáse com o *P. cinnabarinus*. Essas condições teem em vista primeiramente o uso de cogumelos relativamente recentes, isto é, ainda dotados de coloração vermelha. Os extratos devem ser feitos em solução aquosa, tendo de preferencia um pH ácido. A camada de agar sôbre que se semeiam os germens deve ter 3 mm de altura. As suspensões de bactérias devem ser suficientemente diluidas de modo que numa camada de 1,5 a 2 cm não cheguem a produzir turvação perceptivel à vista desarmada. A semeadura deve ser feita colocando cerca de 3 ou 5 ml da suspensão sôbre a placa, fazendo-se pequenos movimentos para que o líquido se espalhe por toda a superfície e retirando-se o excesso por aspiração com pipeta e absorção, nas margens da placa, com pedaços de papel de filtro ou de gaze. O líquido a provar será colocado em depressões de 5 mm de diâmetro, feitas em um ou mais pontos da placa após a semeadura e após remoção do excesso de líquido. Essas depressões são obtidas introduzindo-se tubos de vidro em toda a espessura do agar e aspirando-se os discos de agar cortados pelas paredes do tubo.

O líquido a provar deve ser colocado nas depressões, por meio de pipeta estirada de Pasteur, de tal modo que encha completamente as depressões. Depois da incubação a 37°C a leitura será feita entre 12 e 15 horas mais tarde.

Sem ter ainda outros elementos que nos permitam dizer qual a natureza do princípio bacteriostático em questão, dos dados registrados neste trabalho podemos concluir que no *Polyporus cinnabarinus* existe uma substância praticamente destituida de toxidês para animais de laboratório, a qual é até certo ponto comparavel à penicilina, sendo como esta dotada de ação bacteriostática sôbre *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*. Sôbre a *Pasteurella avicida* tambem foi ve-

rificado consideravel efeito bacteriostático. A substância existente no *Polyporus cinnabarinus* é menos ativa que a penicilina porque atúa em soluções mais concentradas. Sua estabilidade porêm, é maior que a da penicilina. Mesmo em solução aquosa os extratos de *P. cinnabarinus* são capazes de resistir a ação prolongada de temperaturas elevadas.

BACTERIOSTATIC ACTIVITY OF A MACROSCOPIC FUNGUS BELONGING TO THE PORIPORACEAE GROUP "POLYPORUS CINNABARINUS (Jacq.) FRIES."

Abstract

This paper deals with a number of details which have to be considered in assays carried out to test the activity of the extracts of a wood rotting fungus (Polyporus cinnabarinus). Experiments carried out under standart conditions proved a marked bacteriostactic action on several strains of Staphyloccus, Streptococcus and Pasteurella avicida. The conditions which have to be considered refer to the spreading and thickness of the suspension of the bacteria used, the thickness of the agar layer on which the test is performed, the hydrogen-ion concentration of the extract and to the time during which the cultures remain in the incubator before the results are registered.

BIBLIOGRAFIA

1 — Abraham, E. P., E. Chain, C. M. Fletcher, A. D. Gardner, N. G. Heatley, M. A. Jennings, e H. W. Florey — 1941 — Further observations on penicillin. *Lancet*, 2: 177-189.

2 — Dubos, R. J. — 1939 — Studies on a bactericidal agent extracted from a soil bacillus. I — Preparation of the agent. Its activity. *Jour. Exp. Med.*, 70: 1-10.

3 — Dubos, R. J. — 1939 — Studies on a bactericidal agent extracted from a soil bacillus. II — Protective effect of the bactericidal agent against experimental pneumococcus infections in mice. *Jour. Exp. Med.*, 70: 11-17.

4 — Dubos, R. J. e R. D. Hotchkiss — 1941 — The production of bactericidal substances by aerobic sporulating bacilli. *Jour. Exp. Med.*, 73: 629-640.

5 — Flemming, A. — 1929 — On the antibacterial action of cultures of a Penicillium. *Brit. Jour. Exp. Path.*, 10: 226-236.

6 — Foster, J. W. — 1942 — Quantitative estimation of penicillin. *Jour. Biol. Chem.*, 144: 285-286.

7 — Meyer, J. R. — 1944 — Ação bacteriostática da "orelha de páu" vermelha. (Polyporus cinnabarinus). *O Biológico*, São Paulo, 10: 156-161.

8 — Osborne, E. M. — 1943 — On the occurrence of anti-bacterial substances in green-plants. *Brit. Jour. Exp. Path.*, 24 (6): 227-231.

9 — RAMMELKAMPF, C. H. — 1942 — A method for determining the concentration of penicillin in body fluids and exsudates. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 51: 95-97.

10 — SCHMIDT, W. H. e A. J. MOYER — 1944 — Penicillin. Method of Assay. *Jour. Bacteriol.*, 47: 199-208.

11 — WAKSMAN, S. A. e H. B. WOODRUFF — 1940 — The soil as a source of microorganisms antagonistic to disease-producing bacteria. *J. Bact.*, 40: 581-600.

12 — WAKSMAN, S. A. e H. B. WOODRUFF — 1940 — Bacteriostatic and bactericidal substances produced by a soil Actinomyces. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 45: 609-614.

13 — WAKSMAN, S. A. e H. B. WOODRUFF — 1942 — Streptothricin, a new selective bacteriostatic and bactericidal agent, particularly active against gram-negative bacteria. *Proc. Soc. Exp. Bol. Med.*, 49: 207-216.

14 — WAKSMAN, S. A., E. S. HORNING e E. L. SPENCER — 1942 — The production of two antibacterial substances, fumigacin and clavacin. *Science*, 96 (n.º 2487): 202-203.

15 — WAKSMAN, S. A. — 1944 — Purification and antibacterial activity of fumigacin and clavacin. *Science*, 99 (n.º 2568): 220-221.

Vol. 15 — Art. 8 Agosto de 1944

VERIFICAÇÃO DE PULOROSE EM URU (ODONTOPHORUS CAPUEIRA)

POR

P. Nobrega e R. C. Bueno

Do Instituto Biologico de S. Paulo

A verificação, em aves selvagens, de casos espontâneos de certas moléstias que atingem principalmente aves domésticas é sempre interessante, pela importância que eventualmente pode ter na epidemiologia da infecção. Por êsse motivo julgamos útil referir neste trabalho a observação recente de dois casos espontâneos de pulorose em uru [*Odontophorus capueira* (SPIX)], ave que, pelos hábitos, muito se aproxima da galinha doméstica.

Os dois exemplares enviados logo após a morte, para exame, tinham sido aprisionados alguns dias antes em Apucaranã, no Estado do Paraná, e até o momento da remessa ao laboratório não tinham tido contato com galinha ou qualquer outra ave doméstica.

A autópsia revelou, nos dois animais, um intenso processo de enterite hemorrágica, com numerosas petéquias disseminadas pela mucosa do duodeno e metade superior do intestino delgado, que apresentava conteúdo hemorrágico. O baço achava-se aumentado de volume e com alguns pontos pequenos de necrose, na superfície.

As culturas feitas a partir do fígado e conteúdo intestinal de ambas as aves foram positivas para um organismo, que pelas propriedades culturais e bioquímicas foi identificado como *Salmonella pullorum*. O germe, que é fortemente aglutinado pelo sôro anti-*pullorum*, acidifica em 24 h a glicose, manita, xilose, ramnose e manose, e em 8 dias a maltose; não altera a sorbita, rafinose, sacarose, lactose e arabinose; não produz indol e não acidifica o dextro-tartarato (meio de Jordan).

PULLORUM DISEASE IN THE "URU" (ODONTOPHORUS CAPUEIRA).

Abstract

The authors describe two cases of pullorum disease in the uru [Odontophorus capueira (SPIX)], a wild gallinaceous bird of Southern Brazil, whose habits resemble very closely those of the domestic fowl.

Both specimens of uru were caught in the State of Paraná and had no contact with other birds since they were put in captivity.

They died a few days after being caught. The autopsy showed focal necroses in the spleen and a strong hemorrhagic enteritis. In both cases typical strains of Salmonella pullorum were isolated from the liver and intestinal contents.

SOBRE O USO DE DESINFETANTES NA ÁGUA DE BEBIDA, PARA PREVENÇÃO DA CÓLERA AVIÁRIA

POR

J. Reis e A. S. Reis

Do Instituto Biológico de S. Paulo

Embora de uso freqüentemente recomendado, a adição de desinfetantes à água de bebida, como medida preventiva da disseminação da cólera, não encontra, na literatura especializada, a necessária e desejável abonação experimental. Convinha, pois, submeter o assunto a uma rigorosa investigação, que permitisse concluir pela conveniência ou não da aplicação da medida. Êsse, o objetivo do presente trabalho.

As experiências relatadas foram feitas com amostra altamente virulenta de *Pasteurella avicida* (P 307), do tipo fluorescente. Como desinfetantes experimentaram-se, nas proporções em que costumam ser utilizados, o azul de metileno, o permanganato de potássio e o sulfato de cobre, todos de uso assaz difundido entre nós.

O azul de metileno foi usado diluído na razão de 0,2% da água de bebida; o sulfato de cobre na diluição de 0,2%; o permanganato, na de 0,1%.

A pasteurela era misturada à água prèviamente adicionada de desinfetante, na razão de 1 cm^3 por 500 (cultura de 24 hs. em caldo).

Como água, usou-se a de fonte natural (pH 5,4-5,6), a destilada e a de torneira (pH 7,4-7,6).

A prova da virulência da água contaminada, com ou sem desinfetante, era feita por inoculação em pombo, por via intramuscular (dose: 1 cm^3).

Os recipientes de vidro usados na experiência eram mantidos abertos e à temperatura ambiente; sua capacidade era de 100 cm^3.

RESULTADOS

Nos recipientes de contrôle (água + pasteurela, sem desinfetantes) a sobrevivência do germe foi de 5 horas no máximo, na água destilada; na de torneira, não excedeu 3 horas, sendo irregular, já ao fim da primeira hora, a mortalidade dos pombos inoculados, sucumbindo 2 dos 3 animais inoculados; na água de fonte a sobrevivência foi muito maior, excedendo 24 horas.

Verificado que a água de fonte era a que melhores condições ofereceria à sobrevivência do germe, foi ela utilizada para prova da ação dos desinfetantes.

Na mistura água de fonte + azul de metileno + germe, a sobrevivência dêste não excedeu de 1 hora.

Nas misturas de água de fonte e permanganato ou sulfato de cobre a sobrevivência foi, praticamente, nula, pois os animais inoculados logo após a adição do germe à mistura desinfetante resistiram à infecção.

E' bem conhecida, entretanto, a ação deletéria que exercem as substâncias orgânicas sôbre o poder bactericida do permanganato. Para avaliar o grau de confiança que se poderia ter nêsse desinfetante quando adicionado à água de bebida, em condições naturais, e, portanto, sujeita à poluição por fezes e detritos diversos, fez-se a seguinte experiência. Colocaram-se em uma cuba de vidro 200 cm³ de solução a 1% de permanganato e adicionam-se uma pitada de fezes de galinha, deixando-se a solução assim poluida ao ar, pelo período de uma hora. Após êsse tempo, adicionam-se 0,2 cm³ de uma cultura em caldo de pasteurela P 307 e inocula-se imediatamente em pombo 1 cm³ dessa mistura. O pombo inoculado morreu de cólera, o que demonstra claramente a perda do poder desinfetante do permanganato (a experiência foi repetida 4 vezes com o mesmo resultado; idêntico resultado se obteve quando em vez de inocular a mistura em pombo imediatamente após a adição do germe, se deixou medear um intervalo de 1 e de 2 hs, isto é, quando a bactéria permaneceu em contato com a mistura durante 1 ou 2 horas. Na experiência de contrôle, feita simultâneamente (mesmo sistema, exclusão das fezes), os pombos inoculados não morreram, mesmo usando-se dose dupla de Pasteurela (isto é, 0,4 cm³ para 100 cm³ da mistura).

CONCLUSÃO

Impõe-se lògicamente a conclusão de que, em época de epizootia, deve a água ser protegida pela adição de desinfetantes adequados. Êste cuidado deve existir não só enquanto dure a epizootia mas também enquanto perdure a presença de portadores aparentemente sãos.

Dos três desinfetantes referidos, os mais aconselháveis são, teòricamente, o permanganato e o sulfato de cobre. Na prática, porém, só êste último deve ser usado, porque aquele perde, nos bebedouros, muito rápidamente, o poder bactericida.

ON THE ADDITION OF DESINFECTANTS TO THE DRINKING WATER TO PREVENT FOWL CHOLERA

Abstract

Experiments carried on with a view to determining the convenience of adding desinfectants to the drinking water during an epidemic of fowl cholera, showed that of the three desinfectants tested (methylene blue, copper sulphate and potassium permanganate) only the second should be recommended, when added in the proportion of 0,2 g. (grams) per cent to the drinking water.

Vol. 15 — Art. 5 Setembro de 1944

SUBSTRATOS APROPRIADOS PARA O TRANSPLANTE DE ANAEROBIOS, DIRETAMENTE DE COLONIAS DESENVOLVIDAS NA SUPERFICIE DE PLACAS

POR

C. Rodrigues e V. O. Guida

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Sendo o trabalho com culturas puras o fundamento primário da Bacteriologia, a evolução de qualquer ramo desta ciência depende, em caráter absoluto, do maior ou menor êxito e da maior ou menor simplicidade dos métodos que levam àquele objetivo.

Por esta razão a Bacteriologia dos anaerobios, embora surgisse ao mesmo tempo que a dos aerobios, (PASTEUR 1861), teve desenvolvimento entravado até ha apenas 30 anos, quando as gangrenas de guerra forçaram seu estudo e progresso. Mesmo assim existem, ainda hoje, pobreza e deficiência técnicas suficientes para desencorajar a maioria dos que se sentem atraídos por tão interessante campo de pesquisa. Na verdade, êste estudo é ainda mais dificultado pela existência, em literatura, de numerosos equivocos, acumulados por toda uma geração de pesquisadores mal servidos de processos de isolamento.

Até ZEISSLER, 1917 e a Comissão Ingleza (Medical Research Committee, 1919), a técnica usual de isolamento de anaerobios se baseava no emprêgo de diluições sucessivas. Estas se faziam, ou em meios de cultura liquidos, ou na massa de meios solidos à temperatura de estufa. No primeiro caso, as diluições eram feitas até que na diluição final resultasse um único germen; no segundo, era suficiente diluir o material de maneira que os germens existentes fossem bastante raros, e resultassem colonias isoladas.

A técnica de diluições sucessivas ainda hoje é bastante difundida, graças à sua única qualidade de ser acessivel a qualquer laboratório.

O processo de culturas na massa de meios solidos resolveu em parte a questão do isolamento, porque os anaerobios crescem bem na profundidade do meio e dão colonias isoladas; entretanto, traz consigo grande número de desvantagens: necessidade de meios transparentes; impossibilidade de emprêgo para germens fortemente aerogenos, que despedaçam o meio de cultura; extrema semelhança entre colonias de germens diferentes na massa; dificuldades na retirada, em estado de pureza, das colonias desejadas; mau crescimento de germens muito exigentes.

O método de diluições sucessivas em meio líquido, proposto por LISTER e adaptado aos anaerobios por BURRI, é pouco empregado porque tem o inconveniente de ser incerto e trabalhoso; consiste em tomar uma gota de um líquido que contém os germens, juntar a 10 cc. de caldo estéril, agitar, passar outra gota para novo tubo com 10 cc., e assim por diante, até que um tubo só contenha um germen. E' evidente que êste método só pode prestar serviços quando, na emulsão original, o número de germens a isolar é substancialmente maior que o dos contaminantes.

Além desses processos, usaram-se também substâncias químicas de ação impediente sôbre as bacterias. Êste método, todavia, não foi adotado porque afasta sómente alguns contaminantes.

De passagem deve ser dito que os processos de cultura unicelular, por micromanipulação, são excessivamente complexos e laboriosos para terem aplicação corrente. As diversas técnicas conhecidas, desde BARBER, 1914, se equivalem nos resultados, como também nas dificuldades.

O excelente resultado obtido no isolamento de aerobios, por meio de semeadura na superfície de placas de meio sólido, determinou desde cedo a tendência para aplicar aos anaerobios o mesmo sistema. Pode-se dizer entretanto que sómente com ZEISSLER, o M. R. C. e FORTNER o problema ficou resolvido de forma satisfatória. Especialmente êste último brindou os bacteriologistas com um método que, a par de sua extrema simplicidade, não fica a dever em eficácia aos melhores conhecidos.

O método de ZEISSLER se baseia na escolha de um substrato apropriado, agar-sangue de carneiro ou humano a 10%, glicosado a 1%. O ambiente propício é obtido pela cultura em recipientes dos quais se extrae o ar. O método do M. R. C., se apoia no uso de placas de agar sôro, em jarra de Mc Intosh. O método FORTNER utilisa substrato semelhante ao aconselhado por ZEISSLER; a obtenção de ambiente favorável é conseguida pelo cultivo simultâneo de bacterias aerobias em outra parte da placa de cultura.

Com base neste método idealisado por FORTNER, de cultura associada, foi possível desenvolver no serviço de anaerobios da Secção de Bacteriologia, no Instituto Biologico, um processo com o qual facilmente se obtem culturas de anaerobios do gênero *Clostridium*, na superfície de meios solidos, sob a forma de colonias isoladas, ou de véo, de que por diferentes processos se pode eliminar ou cercear o espalhamento. (RODRIGUES 1936). Com isto se torna possível aplicar a êstes micro-

organismos os mesmos métodos de isolamento que a prática e a experiência já demonstraram serem suficientemente eficazes para o trabalho dos germens aerobios.

*

* *

Uma nova dificuldade entretanto se faz desde logo notar, pela frequente inviabilidade dos inóculos retirados da placa e semeados em meio de conservação.

O meio de conservação tomado por nós como "standard" é um caldo conforme TAROZZI, isto é, caldo de carne com pedaços de fígado. Para melhor garantia de proteção contra o oxigenio do ar, usa-se recobri-lo com vaselina solida. Êste meio vem sendo empregado com êxito desde há vários anos, na manutenção de culturas de estoque e das coleções, e na rotina habitual. Mas deve ser de preparo recente e regenerado antes do uso, isto é, aquecido, para expulsão do ar dissolvido.

Para a inoculação com material de colonias em placas, o meio oferece ainda o sério inconveniente da camada superficial de vaselina solida, que impede o uso de alça ou agulha nos repiques. Para contornar essa dificuldade, lançamos mão do expediente que consiste em efetuar o repique por intermedio de pipeta Pasteur, com a qual recolhemos a colonia a ser transplantada, juntamente com a parte do meio de cultura que lhe está subjacente. Mesmo assim procedendo, não é raro observar-se inviabilidade do repique em grande proporção de casos, continuando, o método, inseguro.

Demais, o processo de colheita global da colonia e do meio subjacente introduz no método limitações importantes, pois dificulta a colheita de colonias isoladas quando ha aglomeração, e impede seu uso quando mais necessário se torna, no isolamento a partir de material fortemente contaminado, em placas ricas. Estas dificuldades têm sido contornadas pela semeadura de pequenos inóculos na superfície das placas, e pelo uso de várias placas, com esgotamento paulatino, repetindo-se a operação até ser obtida uma disposição conveniente das colonias.

*

* *

Com o intuito de evitar a insegurança e a perda de tempo e material, envolvidos na situação acima descrita, foram planejadas e executadas algumas experiências, no intuito de selecionar um meio de cultura que:

a) — possibilitasse o crescimento a partir de inóculos mínimos;

b) — permanecesse utilisavel bastante tempo depois de preparado;

c) — désse clara indicação de vegetação.

Numa primeira série experimental, procuramos determinar quais os meios mais favoráveis ao desenvolvimento de anaerobios exigentes, quando semeados em inoculos mínimos.

Empregamos como fonte uma cultura de *Clostridium chauvoei* em Tarozzi comum, sob vaselina, incubada a 37° — 24 horas; esta cultura foi semeada pura e diluida a 1/10 e 1/100 em séries de 10 tubos de cada meio, com alça de platina e, comparativamente, com pipeta Pasteur. Depois de semeados, os tubos eram levados à estufa a 37°, e procedia-se à leitura após 24 e 48 horas. Como podemos verificar na tabela 1, há sensiveis diferenças entre os meios escolhidos, sendo alguns mais favoráveis que outros ao desenvolvimento dos germens. A composição dêsses diferentes meios consta sucintamente da seguinte relação:

Meio de V. F. — Êste meio, muito favoravel a uma cultura rápida e abundante dos anaerobios, tem origem no meio de Stickell e Meyer. Consiste em uma mistura de partes iguais de carne de boi desengordurada e fígado de boi, finamente triturados e mergulhados em caldo, pH 7,6. Esterilização 120°, 30 minutos.

Meio de Sordelli — Junta-se a um caldo (pH 8,0) 25% de extrato hepatico, obtido por maceração durante 2 horas a 45°, de uma parte de fígado e duas de solução de cloreto de sodio a 5%. Aquece-se a 80°, filtra-se em vela, distribue-se.

Meio de Mac Clung e Mac Coy — Aquece-se a vapor fluente durante uma hora uma mistura de 1 ou 2% de fígado sêco, 5% de farinha de milho e água. Distribue-se e esteriliza-se a 120°, 2 horas.

Meio de Spray — Juntam-se 4 volumes de água distilada ao sangue total de carneiro, esteriliza-se e obtem-se um líquido côr de chocolate, ao qual se junta agar — a 2,5%. Distribue-se e esteriliza-se.

Agar-Amido — E' um meio semi-solido preparado com caldo peptonado ao qual acrescentamos 10 grs. de amido e 2,5 grs. de agar por litro.

Meio de Tarozzi, modificação usada no Instituto Biologico — E' um meio preparado com caldo simples, contendo um pedaço de fígado ou carne, recoberto com vaselina, com pH7,6. Distribuido e esterilizado em autoclave a 120° durante 30 minutos. Para o estudo aqui descrito, foi suprimido o tampão de vaselina.

Tarozzi sangue — Idêntico ao anterior, com acréscimo de sangue crú de carneiro, desfibrinado a 5%, colocado assepticamente após a esterilização.

Meio viscoso — Baseado no meio de Scott Conforme Secção Bact. do Instituto Biológico.

Fígado moído . . . . . 1 quilo
Água . . . . . 1 litro
Deixar 1 hora vapor fluente.
Filtrar em algodão.
Juntar peptona 0,2%
Sulfato ferrico 0,2%
Glicose 0,1%
Acertar pH 7,8. Filtrar em algodão de vidro.
Aquecer 50°, juntar 10% de uma emulsão bem límpida de agar a 2%, em água da bica.
Misturar a distribuir em camada alta.
Esterilizar a 115° 20 minutos.

Hibler — Água, 2 partes, peptona 1%, NaCl. 3%. Cérebro de carneiro, 1 parte. pH 7,0.

Caldo Fígado —

Fígado	1000 grs.
Água	2000 cc.
Peptona	1%
Na Cl	0,5%

Tiram-se as gorduras do fígado e passa-se na máquina de moer; deixa-se 3 a 4 horas macerando, coa-se e põe-se em B. M., 30'. Filtra-se e junta-se a peptona e o cloreto de sodio. Ferve-se e completa-se o volume primitivo. Acerta-se o pH 7,2.

Precipitam-se os fosfatos; esfria-se, filtra-se e distribue-se. Autoclava-se 115° 30'. —

TABELA 1 A

Semeadura com agulha, partindo de cultura em Tarozzi do *Cl. chauvoei*

Meio de cultura	N.° de tubos	Matriz: Tarozzi não diluido		Matriz: Tarozzi diluido 1/10		Matriz: Tarozzi diluido 1/100	
		Vegetação		Vegetação		Vegetação	
		24 hs.	48 hs.	24 hs.	48 hs.	24 hs.	48 hs.
Tarozzi comum	10	10		10		9	9
V. F.	10	10		10		10	
Tarozzi sangue . . .	10	10		10		8	10
Caldo fígado	10	8	8	0	4	0	3
Viscoso	10	10		0	9	0	7
Mac Clung	10	0	0	0	0	0	0
Spray	10	0	0	0	2	0	0
Hibler	10	0	0	0	0	0	0
Sordelli	10	3	3	0	0	0	0
Agar amido	10	—	9	0	9	0	5

TABELA 1 B

Semeadura com pipeta Pasteur, a partir de cultura em Tarozzi do *Cl. chauvoei*

Meio de cultura	N.º de tubos	Matriz: Tarozzi não diluido		Matriz: Tarozzi diluido 1/10		Matriz: Tarozzi diluido 1/100	
		Vegetação		Vegetação		Vegetação	
		24 hs.	48 hs.	24 hs.	48 hs.	24 hs.	48 hs.
Tarozzi comum	10	10		10		2	8
V. F.	10	10		10		10	
Tarozzi sangue . . .	10	10		10		10	
Caldo fígado	10	10		9		10	
Viscoso	10	10		8	10	10	
Mac Clung	10	0	0	0	0	0	0
Spray	10	10		5	5	0	0
Hibler	10	0	5	3	4	0	0
Sordelli	10	0	0	0	0	0	0
Agar amido	10	5	5	0	8	0	8

De acôrdo com os resultados das verificações expressas nas tabelas 1 A e 1 B, foram escolhidos para as verificações ulteriores os seguintes meios: V. F., Tarozzi, Viscoso, Tarozzi-sangue. O agar-amido, que também se mostrou favoravel à vegetação foi abandonado devido a seu aspecto, normalmente turvo, o qual dificulta a verificação de crescimento de bacterias não gazogenas, e por ser, além disso, um meio solido.

Os anaerobios utilizados para os trabalhos subsequentes foram escolhidos entre as espécies mais sensiveis, com as quais maiores índices de inviabilidade dos repiques têm sido observados: fazem parte da Coleção de anaerobios do Instituto Biológico e têm as seguintes características:

AD: Amostra de *Clostridium novyi*, recebida de ZEISSLER, Alemanha, em 1929.

A. 33: Amostra de *Clostridium putrificus*, recebida de WEINBERG em 1929.

A. 43: Amostra de *Clostridium chauvoei* isolada da vacina contra a manqueira, do Instituto Oswaldo Cruz.

A. 42: Amostra de *Clostridium tetani*, recebida de ARAGÃO, Manguinhos.

A. 56: Amostra de *Clostridium botulinum*, recebida da América do Norte por intermedio do Dr. MELLO, da Fac. de Med.

A. 77: Amostra de *Clostridium chauvoei*, recebida em 1936, de HENDERSON, Lister Institute, Londres.

A. 228: Amostra de *Clostridium novyi*, recebida em 1937, do Dr. SOUTO, do Instituto Butantan.

A. 298: Amostra de *Clostridium difficilis*, recebida do Dr. SOUTO, do Instituto Butantan, em 1940.

A. 223: Amostra de *Clostridium putrificus*, do Instituto Pasteur, Paris, recebida por intermedio do Dr. SOUTO.

A B: Amostra de *Clostridium cochlearius*, recebida de ZEISSLER, Alemanha, em 1929.

0608: Amostra de *Clostridium chauvoei*, isolado de material de bezerro morto de manqueira em 14-9-1942.

0609: Amostra de *Clostridium* sp. oferecida à Secção p/ Dr. PRADO, Instituto Bacteriológico do Chile, em 1942.

1.ª Experiência

Culturas recentes, em Tarozzi, dos *Clostridia* acima enumerados, eram semeadas em placas, colocadas imediatamente em jarra de anaerobiose e levadas à estufa de 37°, onde permaneciam três dias. Logo após a abertura da jarra, procedia-se ao repique com agulha de platina, retirando, por um simples toque na colonia, o material que se semeava nos meios escolhidos; repicavam-se no mínimo 10 tubos de cada meio. Êstes tubos eram levados à estufa à 37° e observados até 36 horas.

Conforme demonstra o protocolo detalhado desta experiência, (Tab. 3), o coeficiente de vegetação nos meios V. F. e Viscoso é extremamente alto, ao passo que no meio de Tarozzi comum e Tarozzi sangue é bem mais baixo.

De 180 tubos semeados com os anaerobios já mencionados, verificou-se nos dois primeiros substratos, uma porcentagem de crescimento que confere ao seu uso grande segurança de viabilidade. (Tab. 2).

TABELA 2

Viabilidade de inóculos mínimos de anaerobios exigentes

	Tubos semeados	Tubos não vegetados	Tubos vegetados	% viaveis
V. F.	180	18	162	90%
Viscoso	180	17	163	90,5%
T. comum	180	89	91	55%
T. sangue	180	107	73	45%

TABELA 3

Coeficiente de vegetação de anaerobios exigentes nos quatro meios selecionados

Meio de cultura	A. 43 *(chauvoei)*				A. 77 *(chauvoei)*				0608. *(chauvoei)*			
	N.º de tubos semeados	Tempo decorrido entre a abertura da jarra e o repique	Tubos vegetados		N.º de tubos semeados	Tempo decorrido entre a abertura da jarra e o repique	Tubos vegetados		N.º de tubos semeados	Tempo decorrido entre a abertura da jarra e o repique	Tubos vegetados	
			18 h.	36 h.			18 h.	36 h.			18 h.	36 h.
Tarozzi sangue	15	5'	15		15	8'	15		15	5'	14	14
Tarozzi comum	15	4'	0	12	15	10'	15		15	11'	10	10
V. F.	15	3'	0	15	15	6'	15		15	7'	15	
Viscoso	15	7'	0	12	15	12'	12	15	15	13'	14	14

Meio de cultura	A. 33 *(putrificus)*				A. 223 *(putr.)*				A. 56 *(bot.)*			
	N.º de tubos semeados	Tempo decorrido entre a abertura da jarra e o repique	Tubos vegetados		N.º de tubos semeados	Tempo decorrido entre a abertura da jarra e o repique	Tubos vegetados		N.º de tubos semeados	Tempo decorrido entre a abertura da jarra e o repique	Tubos vegetados	
			18 h.	36 h.			18 h.	36 h.			18 h.	36 h.
Tarozzi sangue	15	8'	15		15	15'	0	0	15	15'	2	2
Tarozzi comum	15	10'	15		15	7'	0	0	15	10'	1	1
V. F.	15	6'	15		15	12'	15		15	8'	0	5
Viscoso	15	12'	12	15	15	6'	15		15	8'	8	12

TABELA 3 (Continuação)

Coeficiente de vegetação de anaerobios exigentes nos quatro meios selecionados

Meio de cultura	A D *(novyi)*				A. 228 *(novyi)*				A. 42 *(tetani)*			
	N.º de tubos semeados	Tempo decorrido entre a abertura da jarra e o repique	Tubos vegetados		N.º de tubos semeados	Tempo decorrido entre a abertura da jarra e o repique	Tubos vegetados		N.º de tubos semeados	Tempo decorrido entre a abertura da jarra e o repique	Tubos vegetados	
			18 h.	36 h.			18 h.	36 h.			18 h.	36 h.
Tarozzi sangue	15	15'	9	15	Contaminado				15	12'	5	5
Tarozzi comum	15	15'	6	15	15	7'	0	14	15	0'	15	
V. F.	15	12'	2	15	15	10'	14	15	15	18'	15	
Viscoso	15	17'	13	15	15	11'	15		15	14'	15	

Meio de cultura	A B *(cochlearius)*				A. 298 *(difficilis)*				0609			
	N.º de tubos semeados	Tempo decorrido entre a abertura da jarra e o repique	Tubos vegetados		N.º de tubos semeados	Tempo decorrido entre a abertura da jarra e o repique	Tubos vegetados		N.º de tubos semeados	Tempo decorrido entre a abertura da jarra e o repique	Tubos vegetados	
			18 h.	36 h.			18 h.	36 h.			18 h.	36 h.
Tarozzi sangue	15	7'	0	0	15	14'	0	2	15	12'	0	0
Tarozzi comum	15	15'	0	0	15	20'	0	2	15	5'	0	0
V. F.	15	7'	10	15	15	17'	9	9	15	4'	15	
Viscoso	15	14'	11	15	15	17'	0	10	15	7'	15	

Examinando agora particularmente o crescimento dos diversos anaerobios nestes quatro substratos, verificamos que as amostras de *Clostridium chauvoei* e *Cl. novyi* vegetaram indistintamente em todos. A amostra *Cl. tetani*, sómente no Tarozzi sangue vegetou mal; *Cl. putrificus*, *Cl. cochlearius* e *Cl. difficilis*, assim como a amostra 0609, vegetaram mal nos meios de Tarozzi sangue e Tarozzi comum, mas cresceram ótimamente em V. F. e Viscoso. O *Cl. botulinum* só cresceu regularmente no meio Viscoso.

Pode-se, pois, concluir desta série experimental que os meios V. F. e Viscoso favorecem o crescimento dos *Clostridia* mais exigentes, permitindo, portanto, a semeadura do inóculo mínimo com agulha de platina.

2.ª Experiência.

Admite-se que as culturas de anaerobios em superfície, expostas a uma rápida oxigenação quando colocadas em contáto com o ar ambiente, tornam-se depressa inviaveis. E', entretanto, de prever que, usando-se para o repique substratos especialmente favoraveis, seja possível prolongar o período de viabilidade, pois, assim se permite a vegetação partindo de menor número de bactérias e de bactérias com vitalidade diminuida.

Tendo visto anteriormente que os meios "V. F." e "Viscoso", oferecem condições extremamente favoraveis ao desenvolvimento de pequenos inóculos, projetamos uma segunda série experimental em que, fixadas todas as outras condições, apenas variasse o período de contáto da cultura de superfície com o ar, entre a abertura da jarra e o repique.

Para tal, eram obtidas culturas regulares de anaerobios exigentes em placas de meio de FORTNER, mantidas durante 3 dias a 37° em jarra de anaerobiose. Aberta a jarra e retiradas as placas de cultura, faziam-se, sempre da mesma placa, séries de repique sucessivas, após períodos variaveis de exposição ao ar. Para os repiques usou-se sempre agulha de platina. Os períodos de exposição variavam entre 0' e 7 horas.

Os resultados desta experiência constam do protocolo seguinte. Por êles se verifica que, lançando mão de substratos apropriados, pode-se conseguir cultura viavel mesmo dos anaerobios mais exigentes, ainda após uma exposição de 1 hora ao ar ambiente, na superfície de meios sólidos.

Deve ser levado em consideração, que o suporte para o crescimento em placa de cultura foi agar-sangue de carneiro conforme FORTNER, não glicosado. Neste meio a esporulação se dá com sufi-

TABELA 4

Persistência de anaerobios exigentes, em contáto com o ar ambiente.

Tempo após abertura da jarra	Meio de cultura	*Cl. chauvoei* A. 43		*Cl. tetani* A. 42		*Cl. novyi* A D		*Cl. cochlearius* A B rug.	
		Leitura		Leitura		Leitura		Leitura	
		24	48	24	48	24	48	24	48
0'	V. F.	10/10	10/10	3/10	10/10	9/10	9/10	10/10	10/10
	Viscoso	7/10	10/10	10/10	10/10	8/10	8/10	0/10	10/10
15'	V. F.	10/10	10/10	3/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
	Viscoso	6/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
45'	V. F.	10/10	10/10	2/10	10/10	8/10	8/10	10/10	10/10
	Viscoso	6/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	8/10	8/10
1 hora	V. F.	10/10	10/10	4/10	10/10	9/10	9/10	10/10	10/10
	Viscoso	6/10	10/10	10/10	10/10	8/10	8/10	0/10	8/10
2 horas	V. F.	10/10	10/10	1/10	10/10	5/10	6/10	10/10	10/10
	Viscoso	4/10	10/10	10/10	10/10	6/10	6/10	0/10	9/10
3 horas	V. F.	10/10	10/10	1/10	10/10	2/10	6/10	10/10	10/10
	Viscoso	3/10	10/10	10/10	10/10	6/10	6/10	0/10	9/10
5 horas	V. F.	10/10	10/10	0/10	10/10	9/10	6/10	10/10	10/10
	Viscoso	0/10	10/10	9/10	10/10	0/10	5/10	0/10	5/10
7 horas	V. F.	3/10	10/10	0/10	10/10	0/10	5/10	10/10	10/10
	Viscoso	0/10	10/10	9/10	10/10	0/10	6/10	0/10	5/10

Numerador = n.° de tubos vegetados.
Denominador = n.° de tubos semeados.

ciente precocidade para estarem presentes esporos em cultura de 3 dias. A conclusão é, portanto, válida para culturas esporuladas.

Os resultados apresentados na tabela 4 fornecem um satisfatório resumo do comportamento dos meios. A semeadura de *Clostridium chauvoei* em 80 tubos de Viscoso e V. F., após diversos períodos de exposição deu uma porcentagem de crescimento de 100% após 48 horas; o *Clostridium tetani* semeado em 80 tubos de cada meio também forneceu 100% de vegetação; com o *Clostridium novyi*, o rendimento foi de cerca de 68,7%, decaindo o crescimento nos tubos a partir de 1 hora, para se conservar mais ou menos constante até 7 horas; com o *Clostridium cochlearius* a viabilidade em meio de V. F. foi de 100% até 7 horas, ao passo que o Viscoso mostrou-se menos favoravel, dando um' rendimento de 80%.

3.ª Experiência

E' sabido que a maioria dos substratos utilizados na cultura de anaerobios perde rapidamente a capacidade de permitir vegetação. Os meios geralmente usados devem ser de preparo recente, ou regenerados por aquecimento logo antes de uso. O emprêgo de camada protetora de vaselina ou parafina apenas aumenta o prazo de utilização, sempre curto. Decorre disso que, para ser de fato efetivo e simples, não basta que um substrato apresente, logo após o preparo, condições de escolha para a vegetação de anaerobios. E' indispensavel que seja suficientemente estavel, para permanecer útil durante um longo período. Para determinar se os meios V. F. e Viscoso preenchiam também esta exigência, foi delineada uma terceira série experimental em que, idênticas todas as demais condições, variou o período decorrente entre o preparo dos meios e sua utilização. As culturas de partida foram obtidas da mesma forma que nas séries anteriores, isto é, placas de FORTNER semeadas com cultura nova em meio de Tarozzi, mantidas a 37° 3 dias em jarra de anaerobiose. O intervalo entre o preparo dos substratos e sua utilização variou entre 1 e 30 dias. Para os repiques, como nas outras séries, agulha de platina. Nesta série só foi utilisada uma amostra de *Cl. chauvoei.*

Verifica-se pelo exame do protocolo desta série (Tab. 5) que o meio Viscoso, como o V. F., suportaram o crescimento franco do *Clostridium chauvoci*, nas condições especialmente severas impostas pela experiência, mesmo 10 dias após seu preparo. Dos 15 dias em diante já se deixou perceber uma diminuição sensivel da capacidade destes meios para promover a vegetação.

Conclue-se desta série final que, ainda 10 dias após o preparo, os meios V. F., ou Viscoso permitem seguramente o crescimento de anaerobios, a partir de colonias em placas, e tomando-se inóculos mínimos. Deve ser notado que êstes substratos se mantiveram à temperatura e iluminação ambientes durante todo o período da experiência, e que não eram reaquecidos préviamente ao uso.

TABELA 5

Influência do envelhecimento do substrato sôbre a capacidade de permitir vegetação

Amostra A. 43 *(Cl. chauvoei)*

Meios de cultura	N.º de tubos	1 dia		5 dias		10 dias		15 dias		25 dias		30 dias	
		Leitura		Leitura		Leitura		Leitura		Leitura		Leitura	
		24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48
Viscoso	10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	2/10	8/10	0/10	5/10	0/10	6/10
V. F.	10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	0/10	10/10	0/10	1/10	0/10	2/10

Comparando-se o comportamento dos meios V. F. e Viscoso nas condições impostas pelas diversas séries experimentais efetuadas, nenhuma superioridade se nota que permita eleger qualquer dêles.

A única diferença sensivel entre ambos decorre de sua composição e aspecto, que sendo uniforme e transparente no meio Viscoso, favorece a percepção de crescimento. O aspecto irregular e turvo do meio V. F. pode trazer dificuldade nêste sentido. Deve entretanto notar-se que no meio "Viscoso" as culturas não se mantem viaveis por muito tempo. Não é apropriado para a conservação.

RESUMO

No sentido de contornar uma grave dificuldade encontrada habitualmente no estudo dos anaerobios, foram elaboradas algumas séries experimentais, tendentes a selecionar um meio de cultura que, como suporte aos repiques a partir de colonias em placas, preenchesse os seguintes requisitos:

a) — facilitar o crescimento a partir de inóculos mínimos:

b) — permanecer utilizavel bastante tempo após o preparo;

c) — dar clara indicação de vegetação.

Uma série fundamental, abrangendo 10 diferentes substratos, foi observada em igualdade de condições. De acôrdo com o por ela ilustrado, puderam ser inicialmente selecionados 4 dentre êles; o padrão para esta primeira seleção foi dado pela possibilidade de promover vegetação a partir de inóculos mínimos.

Numa segunda série foi verificada a capacidade vegetativa de 12 amostras de anaerobios do gênero *Clostridium*, abrangendo várias espécies escolhidas entre as mais sensiveis e exigentes, nos 4 substratos anteriormente selecionados. Os repiques eram feitos a partir de inóculos mínimos, obtidos tocando-se apenas com a agulha de platina uma colonia em meio de FORTNER. Foi possível nesta segunda série experimental distinguir os dois substratos V. F., e Viscoso, como os mais favoraveis.

A composição do meio V. F., descrito por WEINBERG e GOY 1924 é a seguinte: mistura, em partes iguais, de carne de boi desengordurada e fígado de boi finamente triturados e mergulhados em caldo, pH 7,6.

A composição do meio Viscoso, baseado no meio de Scott para anaerobios é:

Fígado moído . . . . . 1 quilo
Água . . . . . 1 litro
Deixar 1 hora vapor fluente.
Filtrar em algodão.
Juntar peptona 0,2%
Sulfato ferrico 0,2%
Glicose 0,1%
Acertar pH 7,8. Filtrar em algodão de vidro.
Aquecer 50°, juntar 10% de uma emulsão bem límpida de agar a 2%, em água da bica.
Misturar e distribuir em camada alta.
Esterilizar a 115° 20'.

Partindo de anaerobios sensiveis, submetidos, sob a forma de colonias, ao ar ambiente, foi possível determinar, numa terceira série experimental, que a vegetação ainda ocorre após 60' de exposição, desde que se usem substratos convenientes. Certas amostras ainda vegetam francamente após 7 horas de contacto com o ar à temperatura ambiente..

Na quarta série, procurou-se determinar o período máximo decorrido entre o preparo dos meios V. F., e Viscoso e sua utilização, sem perda sensivel de sua capacidade para promover vegetação. Foi verificado que êsse período, idêntico para ambos, é de 10 dias.

De acôrdo com as observações efetuadas, os meios V. F., e Viscoso, indistintamente, prestam-se como suporte para o crescimento de anaerobios a partir de inóculos mínimos. Os outros meios não são favoraveis. O meio Viscoso, devido à sua homogeneidade e translucidez, indica mais facilmente o crescimento que o meio V. F., mas não é apropriado para a conservação. No mais, ambos se equivalem.

CONCLUSÃO

Para a subcultura de anaerobios vegetados sob a forma de colonias na superfície de meios solidos, a maioria dos substratos conhecidos não oferece condições suficientes.

Os meios de cultura "V. F", e "Viscoso", permitem o repique de culturas nestas condições, mesmo a partir de inóculos mínimos, obtidos pelo toque da colonia com agulha de platina.

Usando êstes substratos, obtem-se 100% de repiques viaveis, de colonias expostas 60' ao ar ambiente. Certas amostras crescem francamente ainda após 7 horas de exposição.

Tanto o meio "V. F." como o "Viscoso" mantém inalteradas suas propriedades até 10 dias após o preparo.

O meio "Viscoso" é translucido e homogenio favorecendo a percepção do crescimento. Entretanto, não deve ser utilizado para a conservação das culturas.

ADEQUATE SUBSTRATA FOR THE TRANSFER OF ANAEROBES DIRECTLY FROM COLONIES DEVELOPING ON THE AGAR BLOOD SURFACE

A b s t r a c t

The great majority of the usual substrata are not reliable enough for the successful transfer of colonies of anaerobes developing on the surface of solid media.

Of several media tested, the most favorable ones were the "Viscoso" and the "V. F.". They consistently afforded successful transfer, even from colonies that had been exposed to air during 60 minutes.

Some of the anaerobes tested were still viable 7 hours after exposition of the colonies to air, provided that favorable media were used for the transfers. The culture medium here alluded to as "Viscoso" is a modification of the known "Scott's medium" for cultivation of anaerobes.

BIBLIOGRAFIA

FORTNER, J. — 1929 — Zur Technik der anaeroben Züchtung. *Centralblatt für Bakteriologie*, I, O, 110: 233-256.

HIBLER, E. V. — 1908 — *Untersuchungen über die pathogenen Anaeroben.* Gustav Fischer, Jena. 438 pp.

MAC CLUNG, L. S. e E. MAC COY — 1934 — Studies on anaerobic bacterie. I — A corn Liver medium for the Detection and dilution counts of various anaerobes. *The Journal of Bacteriology.* 28: 267-277.

MAC INTOSH D. e R. FILDES — 1916 — Nouvelle méthode d'isolement et de culture de microbes anaérobes. *Comptes Rendus de la Societé de Biologie*, Paris, 79: 291-293.

RODRIGUES, C. — 1936 — O isolamento de anaerobios em placas. Modificações do processo FORTNER. *Archivos do Instituto Biologico*, S. Paulo, 7: 227-233.

SCOTT, J. A. — 1926 — A method of increasing the virulence of B. chauvoei by the use of ferric salts. *The Journal of Infectious Diseases*, 38: 511-513.

SORDELLI, A. — 1937 — Citado por Weinberg e col. em *Les Microbes Anaerobies*. Monographies de l'Institute Pasteur, pag. 48.

SPRAY, R. S. — 1930 — Heated blood and blood derivatives for cultivation of the hemoglobinophilie organisms. *The Journal of Laboratory and Clinical Medecin*, 16: 166-168.

TAROZZI, J. — 1905 — Über ein leicht in aerober Weise ausfürbares Kulturmittel von einigen bis jetzt für strenge Anaërober gehaltenen Keimen. *Centralblatt für Bakteriologie*, I. O, 38: 619-620.

WEINBERG, M. e P. GOY — 1924 — De l'anatoxine botulinique. *Comptes Rendus de la Societé de Biologie*, Paris, 91: 148-149.

WEINBERG, M., R. NATIVELLI e A. PREVOT — 1937 — *Les Microbes Anaerobies*. Monographies de l'Institute Pasteur.

ZEISSLER, J. — 1917 — Zur Züchtung des Bacillus phlegmonis emphysematosae Eugen Fraenkel. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 43: 878-879.

Vol. 15 — Art. 6 Setembro de 1944

ADAPTAÇÃO DO MÉTODO DO DENSÍMETRO PARA A DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DAS PARTÍCULAS DO ARSENIATO DE CHUMBO

POR

D. A. Souza e C. Amato

Do Instituto Biológico de S. Paulo

Com 8 figuras no texto

STOKES (1846) descobriu a lei sôbre a queda dos corpos em fluidos, a qual é hoje conhecida por Lei de Stokes. Grande tem sido a sua aplicação em diferentes métodos para a determinação do tamanho de partículas de diversos materiais em pó. SVEN ODÉN (1926) publicou um trabalho em que fez extensas considerações acerca de quase todas as publicações sôbre o assunto. BOUYOUCOS (1927) foi quem primeiro descreveu o método do Densímetro para a determinação do tamanho de partículas de substâncias em pó. Posteriormente vários autores, como CASAGRANDE (1934) e outros têm retomado o assunto. Num trabalho anônimo, o Instituto de Pesquisas Tecnológicas de S. Paulo (1941) fixou normas para o ensaio de solos para fins rodoviários, adotando o método do densímetro para a determinação do tamanho de partículas dêsse material. Êsse trabalho serviu de ponto de partida para o presente, que é uma sua adaptação para o caso do arseniato de chumbo. As modificações introduzidas serão justificadas no decorrer da exposição.

A LEI DE STOKES E O MÉTODO DO DENSÍMETRO

Na forma em que geralmente vem apresentada em vários trabalhos, a lei de Stokes se traduz na seguinte fórmula:

$$v = \frac{(d_1 - d_2)\, gD^2}{1800n} \qquad (1)$$

em que

v = a velocidade de queda da partícula em cm por segundo
d_1 = a densidade da partícula em gr/cc
d_2 = a densidade do meio de suspensão em gr/cc
g = a aceleração da gravidade em cm por seg.^{2}
D = o diâmetro médio da partícula em mm
n = a viscosidade do meio de suspensão em *poise*

Simplificamos a fórmula acima como segue: sendo uniforme a velocidade, ela é igual ao espaço percorrido dividido pelo tempo necessário para percorre-lo:

$$v = \frac{a}{T}$$

Substituindo v por $\frac{a}{T}$, g por 980, $d_1 - d_2$ por Δ, e tirando-se o valor de D tem-se a fórmula seguinte:

$$D = 1{,}355 \sqrt{\frac{n}{\Delta} \times \frac{a}{T}} \qquad (2)$$

que serviu de base ao presente trabalho e cuja aplicação exige o conhecimento das quantidades que entram sob o radical.

Determinação de n (viscosidade do meio de dispersão em *poise*). Emprega-se a água como meio de dispersão, pelo que não é necessária essa determinação, pois êsses valores são encontrados em tabelas como a de BINGHAM e JACKSON (1918), cuja reprodução parcial damos a seguir:

TABELA 1
Viscosidade da água em relação à temperatura

Temperatura C.	Viscosidade *poise*	Temperatura C.	Viscosidade *poise*
10	0,01307	21	0,00981
11	1271	22	958
12	1236	23	936
13	1203	24	914
14	1171	25	894
15	1140	26	874
16	1111	27	854
17	1083	28	836
18	1056	29	818
19	1030	30	801
20	1005		

Determinação de Δ (diferença entre a densidade da partícula d_1 e a da água d_2). — A densidade da água d_2 para diversas temperaturas é também encontrada em tabelas (Smithsonian Tables, por exemplo). Sendo pequena a sua variação entre 10° e 30° C., a densidade 1 é tomada para qualquer temperatura entre êsses limites, pois o êrro introduzido dessa forma é mínimo e pode ser descurado.

A determinação da densidade das partículas ou densidade absoluta do arseniato é feita da seguinte forma: pesa-se um balão aferido de 250 cc com água distilada até o traço; seja P_1 o seu pêso; deita-se

fóra aproximadamente metade da água e juntam-se 20 grs. (aproximação de 0,01 gr.). de arseniato de chumbo préviamente sêco a 100° C.; completa-se o volume até o traço e com pequenas pancadas no balão obriga-se a saír o ar interposto nas partículas; a queda de nível da água indica que havia ar entre elas; repete-se esta operação até que o nivel se torne constante; completa-se o volume e pesa-se novamente o balão; seja P_2 êste novo pêso; sendo P o pêso do arseniato introduzido, a sua densidade absoluta ou densidade das partículas d_1 é dada pela fórmula

$$d_1 = \frac{P}{P + P_1 - P_2} \qquad (3)$$

Sendo conhecido d_1, determina-se Δ pela relação abaixo

$$\Delta = d_1 - 1 \qquad (4)$$

Determinação da altura de queda a e do tempo respectivo T. O densímetro empregado tem bulbo simétrico e apresenta as dimensões dadas na fig. 1.

Tivemos que aumentar um pouco as dimensões do densímetro proposto no trabalho citado do I. P. T. (Instituto de Pesquisas Tecnológicas) devido à dificuldade técnica relativa ao diâmetro da haste, o qual teve que ser aumentado, obrigando assim o aumento do corpo do densímetro. Na sua parte de vidro, este densímetro foi feito pela Oficina Técnica de Vidro de Raymundo Queiroga, à rua Joaquim Nabuco, 64, S. Paulo, e completado por nós na colocação do lastro de chumbo e escala graduada.

A altura de queda das partículas é a distância da superfície livre da suspensão ao centro do bulbo simétrico. Mas é necessário levar-se em conta a elevação de nivel da suspensão ao mergulhar nela o densímetro. Procede-se para isso da seguinte forma: pesa-se o densímetro com aproximação de 0,01 gr., seja p o seu peso; por outro lado, toma-se um cilindro graduado de 1000 cc do qual se mediu a altura h em cm a contar do seu fundo; dividindo-se 1000 pela altura h, tem-se a area da secção reta A do cilindro

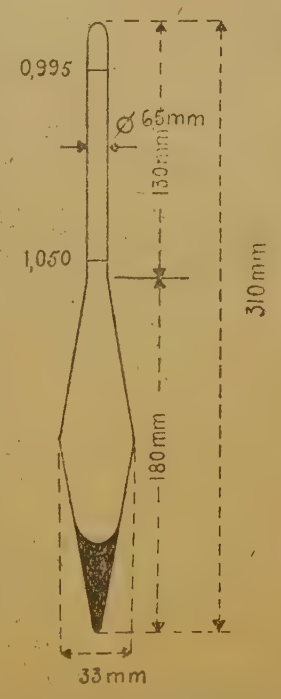


Fig. 1 - Densímetro

$$A = \frac{1000}{h} \qquad (5)$$

A altura da queda das partículas é dada pela fórmula seguinte, na qual se levou em conta a elevação de nível da suspensão:

$$a = a' - \frac{p}{2Ar} \qquad (6)$$

em que

a = cm altura de queda,
a' = cm distância do traço referente a densidade r ao centro do bulbo simétrico
p = gr pêso do densímetro
A = cm^2 área da secção reta do cilindro de 1000 cc.
r = densidade correspondente a a'.

Na fórmula apresentada no trabalho citado do I. P. T. fizemos pequena modificação, a qual, entretanto, facilita a sua aplicação; foi a substituição de V_a (volume da parte imersa do densímetro) por $\frac{p}{r}$, pois que

$$V_a = \frac{p}{r}$$

Sendo p e A constantes para cada densímetro e cilindro graduado que se usam, a substituição, na fórmula (6), de r por seus diversos valores juntamente com os correspondentes valores de a', permite achar os valores de a. Tem-se, então, uma série de valores de a (altura de queda) correspondentes a diversos valores de r (densidade da suspensão). Com êstes dados de a e r constroe-se um gráfico que permitirá achar para qualquer densidade da escala do densímetro, o valor correspondente da altura de queda das partículas. Êste gráfico é feito uma vez por todas e vale para o densímetro e cilindro considerados, que porisso, deverão ser marcados.

O tempo T é determinado cronometrando-se a partir do momento em que a suspensão bem agitada foi deixada em repouso, como será exposto em detalhe mais adeante.

Aparelhagem. 1) Balança para pesar com aproximação de 0,01 gr.; 2) Densímetro de bulbo simétrico, (fig. 1) graduado de 0,995 a 1,050 para ser lido pela parte superior do menisco; 3) Cilindro graduado de 1000 cc de 43 cm, aproximadamente, do fundo até a boca, e 6,5 cm de diâmetro; 4) Cronómetro.

Técnica. Pesam-se 40 grs. com aproximação de 0,01 gr., do arseniato de chumbo sêco a 100° C., que se passam para o cilindro graduado de 1000 cc. Junta-se um pouco de água distilada de modo a formar uma pasta e agita-se com um bastão de vidro suficientemente grosso e comprido, até o arseniato ficar bem misturado e desfeito. Adiciona-se mais água distilada até o traço 1000 cc. Com a palma da mão obtura-se o cilindro e que se agita executando movimentos enérgicos de vae-vem e de inversão. Todo o arseniato deverá

ficar em suspensão na água. Terminada a agitação, coloca-se imediatamente o cilindro sôbre a mesa, introduz-se cuidadosamente o densímetro na suspensão e dá-se ao mesmo tempo partida ao cronómetro. Anota-se a hora de início da sedimentação.

Fazem-se no densímetro as leituras correspondentes a 30", 1', 2', 4', 8', 15', 30', 1 h., 2 h., 8 h., 25 h. e 50 h. a contar do início da sedimentação. Êste é o tempo T.

A densidade r_0 correspondente ao tempo inicial T = 0", que não pode ser lida com segurança no densímetro devido a correntes remanescentes logo após a agitação, é calculada pela fórmula seguinte:

$$r_0 = 1{,}040 - \frac{0{,}04}{d_1} \qquad (7)$$

em que

r_0 = densidade da suspensão no tempo inicial T = 0"

d_1 = densidade absoluta do arseniato de chumbo determinada pela fórmula (3) por processo já descrito.

A fórmula (7) foi deduzida por nós; sua aplicação é de importância, porque a densidade da suspensão no tempo inicial T = 0" precisa ser conhecida, pois é exatamente nesse momento que ela apresenta 100% de material em suspensão. Passado êsse tempo, ela apresenta densidades cada vez menores que não correspondem mais 100% de material em suspensão.

A contar da leitura correspondente a 15', o densímetro é retirado cuidadosamente da suspensão e colocado num outro cilindro com água. Cerca de 15 a 20" antes de cada leitura, mergulha-se lentamente o densímetro na suspensão. A temperatura desta é anotada para cada leitura. A variação de temperatura não deverá exceder de 2° C. durante a sedimentação. Para isso o cilindro com a suspensão deverá ser colocado num ambiente de temperatura constante ou quase, ou, então, num banho de água em vaso cujas paredes metalicas sejam isoladas externamente com cortiça.

Cálculo do diâmetro das partículas por meio do ábaco. A aplicação da fórmula (2) é feita, para maior rapidez e segurança, por meio do ábaco (fig. 2).

Seu uso está indicado pelas linhas que interceptam as paralelas e com pontos de intersecção marcados por numeros consecutivos. Exemplo: sendo n = 0,01, Δ = 9, a = 16, T = 3600" (1 h.) qual é o diâmetro das partículas? Ligando-se por uma reta n = 0,01 a Δ = 9, tem-se o ponto 3 em k; ligando-se do mesmo modo êste ponto a a = 16, tem-se o ponto 5 em k'; ligando-se êste a T = 3600, tem-se o resultado final D = 0,003 mm ou 3 microns.

Não pudemos usar o ábaco de Casagrande, reproduzido no trabalho citado (I. P. T.), por ser a densidade absoluta do arseniato de chumbo aprox. 5 e cair êste valor fóra da sua linha de densidades. Tivemos porisso de projetar e construir um ábaco, cuja reprodução fotográfica é a fig. 2.

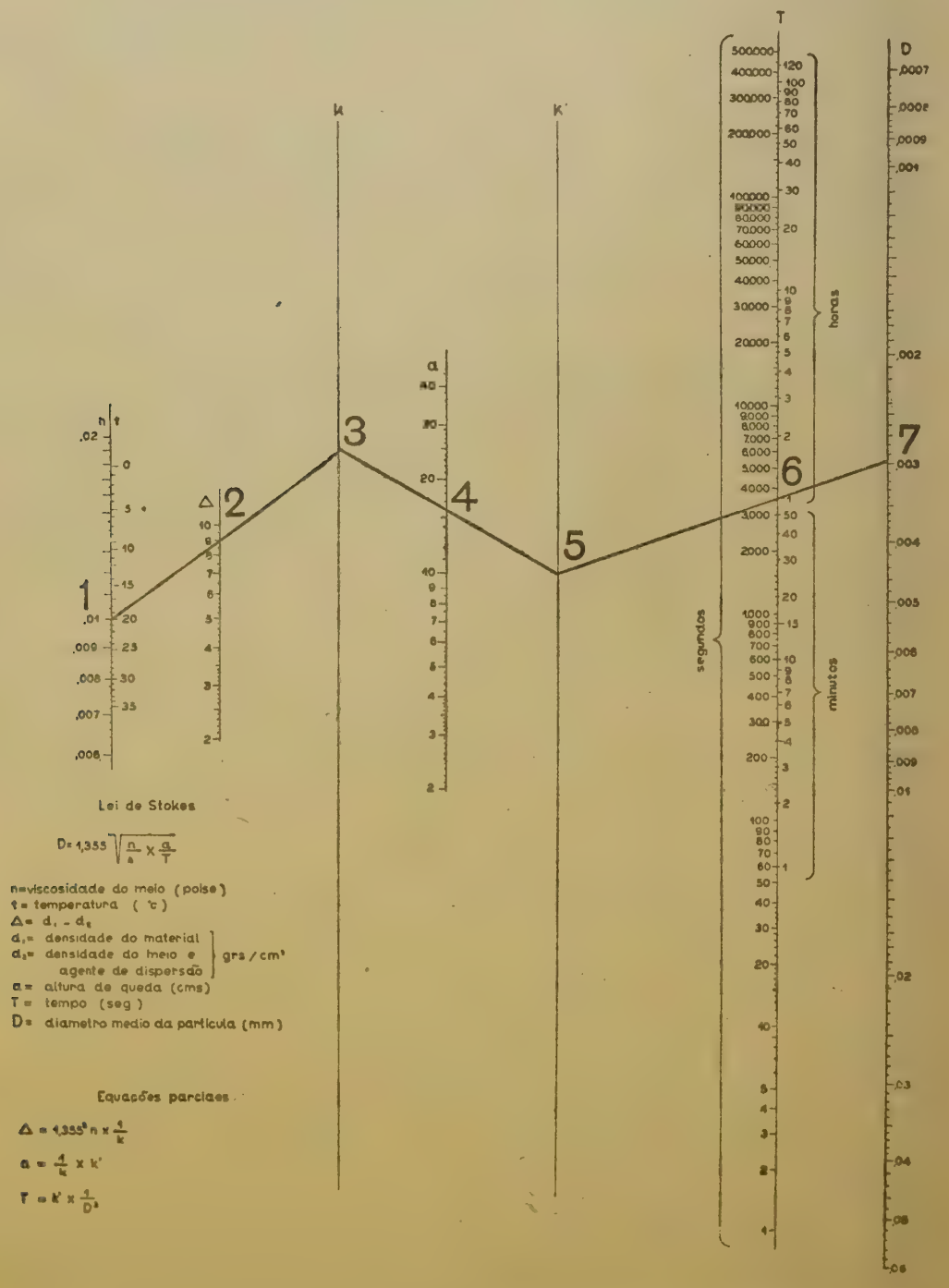


Fig. 2 — Ábaco para o cálculo do diâmetro das partículas

Cálculo do arseniato de chumbo em suspensão. Calcula-se a porcentagem de arseniato em suspensão correspondente a cada leitura do densímetro da seguinte forma: a densidade máxima r_0, que foi calculada pela fórmula (7) corresponde a 100% de arseniato em suspensão; a densidade mínima r observada no densímetro após a sedimentação de todo o arseniato, corresponde a 0% em suspensão; as densidades intermediárias correspondem a porcentagens em suspensão dadas pela fórmula

$$B = \frac{100\ (r_0 - r_1)}{r_0 - r}$$

em que

B = % de arseniato em suspensão correspondente à densidade intermediária r_1

r_0 = densidade máxima da suspensão

r = densidade mínima da suspensão

r_1 = densidade intermediária

Anotação dos dados obtidos. Todos os dados obtidos são dispostos, para efeito de ordem, num quadro como o que segue:

TABELA 2

Disposição dos dados obtidos.

T (Tempo)	(densidade)	a (altura de queda cm)	D (diâmetro mm)	(material em suspensão %)
0"				
30"				
1'				
2'				
4'				
8'				
15'				
30'				
1 h.				
2 h.				
8 h.				
25 h.				
50 h.				

Gráficos. SCHWEYER (1942) e outros autores americanos costumam construir uma curva de porcentagens de tamanhos, dispondo em ordenadas com distâncias logarítmicas o diâmetro das partículas e em abcissas com distâncias uniformes as porcentagens de material

em suspensão. Devemos lembrar aqui que as porcentagens de material em suspensão nada mais são do que porcentagens de material cujas partículas têm diâmetros máximos indicados na curva. Assim, por exemplo, si encontrarmos pela curva que a 5 microns correspondem 40%, devemos interpretar que no arseniato em questão existem 40% de partículas de 5 microns para menos.

O gráfico assim feito permite a leitura de porcentagens entre quaisquer limites de tamanhos expressos na curva; pode-se, por exemplo, determinar as porcentagens de partículas de arseniato entre 30 e 10, entre 10 e 5 e menores do que 5 microns. Êstes dados, obtidos para várias amostras, permitem facilmente a sua comparação no tocante á distribuição dêsses tamanhos.

APLICAÇÃO

Seis amostras de arseniato de chumbo comercial de várias procedências foram ensaiadas pelo método exposto. Designámos cada

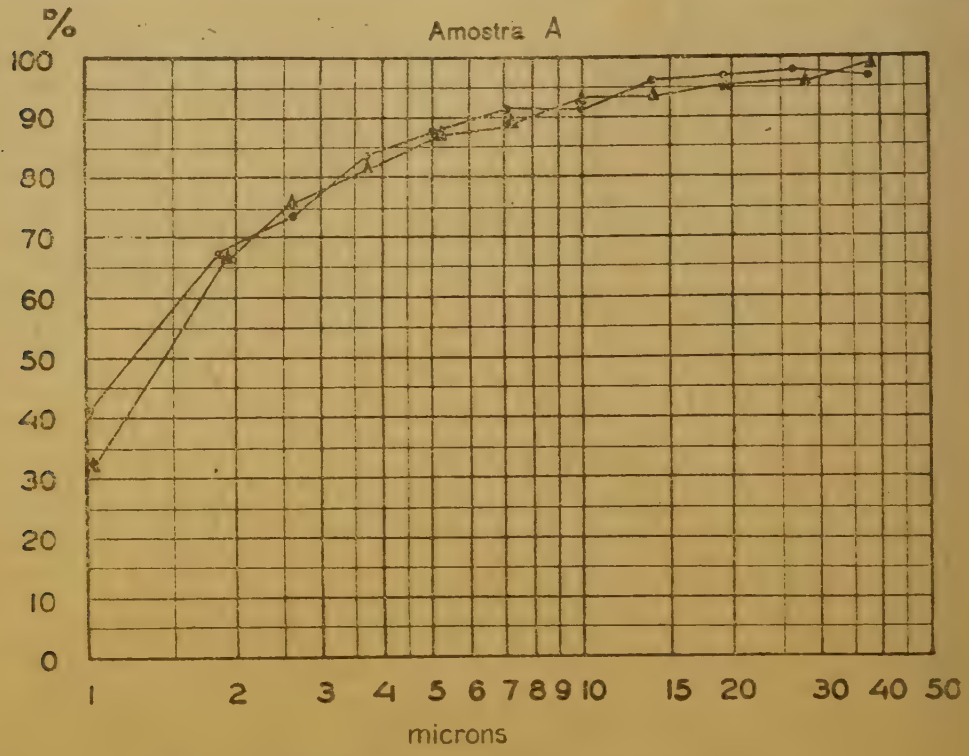


Fig. 3 — Distribuição de tamanhos da amostra A

amostra com uma letra. Cada gráfico apresenta duas curvas correspondentes a dois ensaios: um com a amostra sem adição de defloculante (curva marcada por círculos), outro com a mesma amostra com o sili-

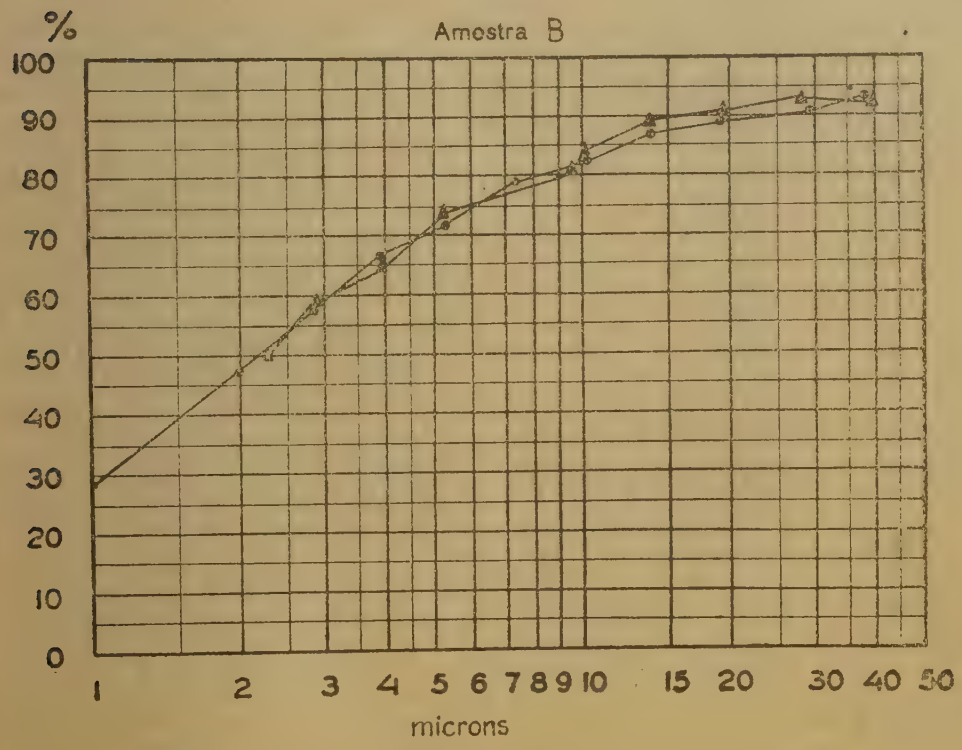


Fig. 4 — Distribuição de tamanhos da amostra B

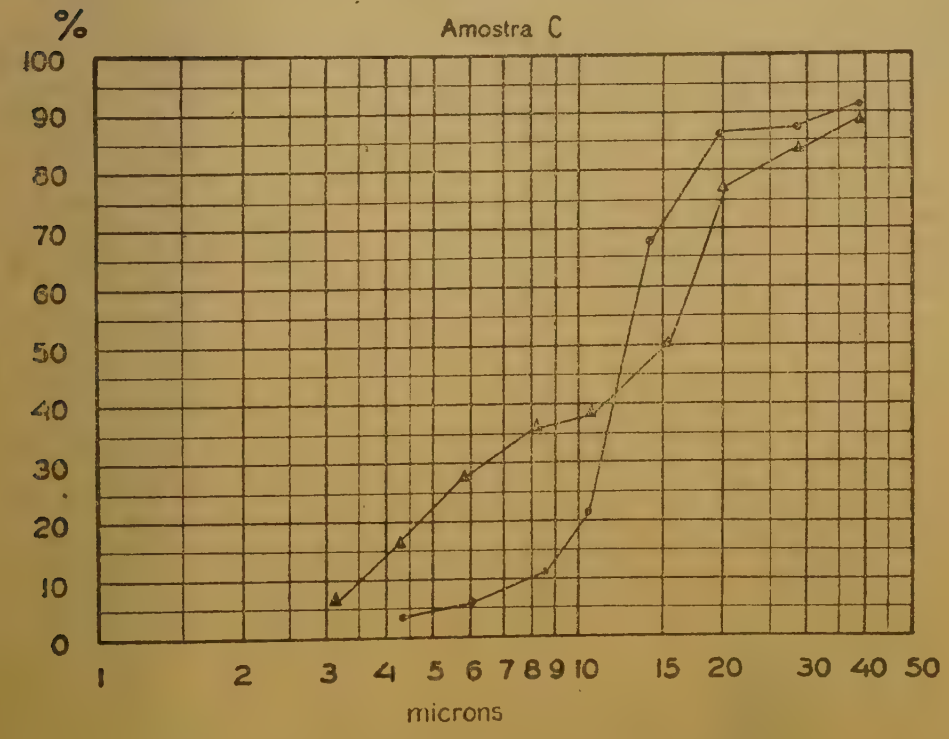


Fig. 5 — Distribuição de tamanhos da amostra C

cato de sódio como defloculante (curva marcada por triangulos). Êste defloculante foi juntado á suspensão na proporção de 20 cc de solução de silicato de sódio de densidade 1,023 a 20° C., antes de completar o volume a 1000 cc e agitar.

Nota-se uma ação pronunciada do defloculante em algumas amostras, enquanto em outras ela é mínima ou nula; neste último caso, trata-se provavelmente de amostras já altamente defloculadas por adição de defloculante adequado, pelo próprio fabricante. Estão neste caso as amostras A e B, figs. 3 e 4 respectivamente. Em amostras flo-

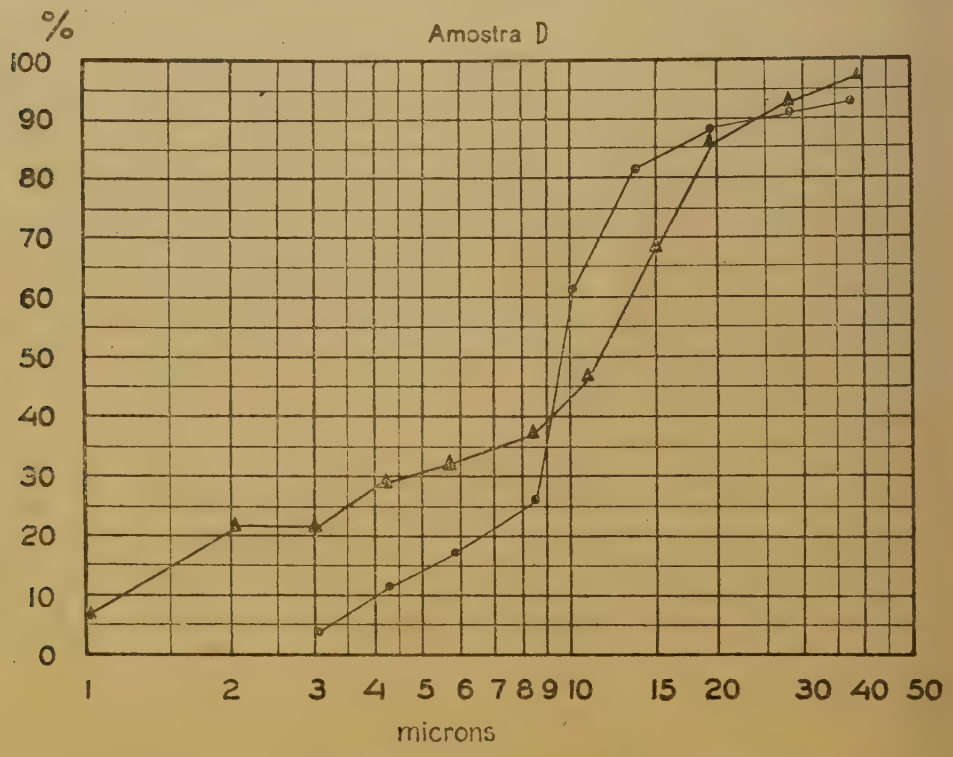


Fig. 6 — Distribuição de tamanhos da amostra D

culadas a ação do silicato de sódio é bastante pronunciada, como se pode ver em C e D, figs. 5 e 6 respectivamente; mas nem sempre essa ação é uniforme para os diversos tamanhos de partículas. Na amostra E, fig. 7, houve defloculação em todos os tamanhos abrangidos pela curva. Na amostra F, fig. 8, a defloculação foi enorme, o que se nota pelo grande afastamento das duas curvas entre si.

O tamanho real das partículas do arseniato de chumbo, ou outro material, deve ser lido na curva mais elevada que se possa conseguir por meio de um defloculante adequado. Neste trabalho, estudando algumas amostras de arseniato de chumbo, empregámos o silicato de

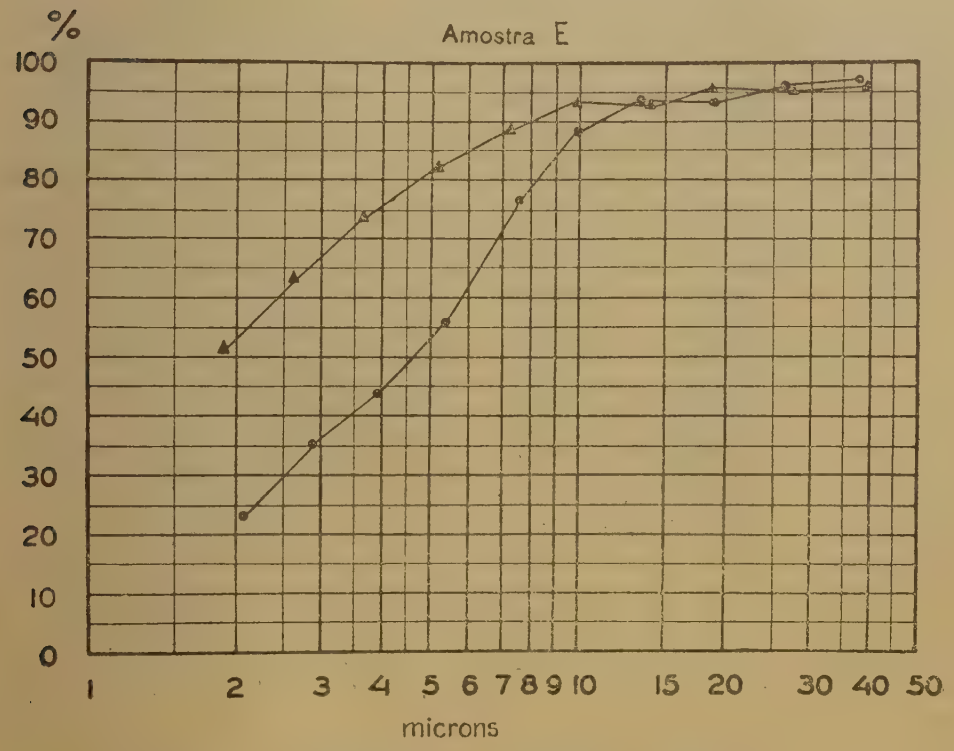


Fig. 7 — Distribuição de tamanhos da amostra E

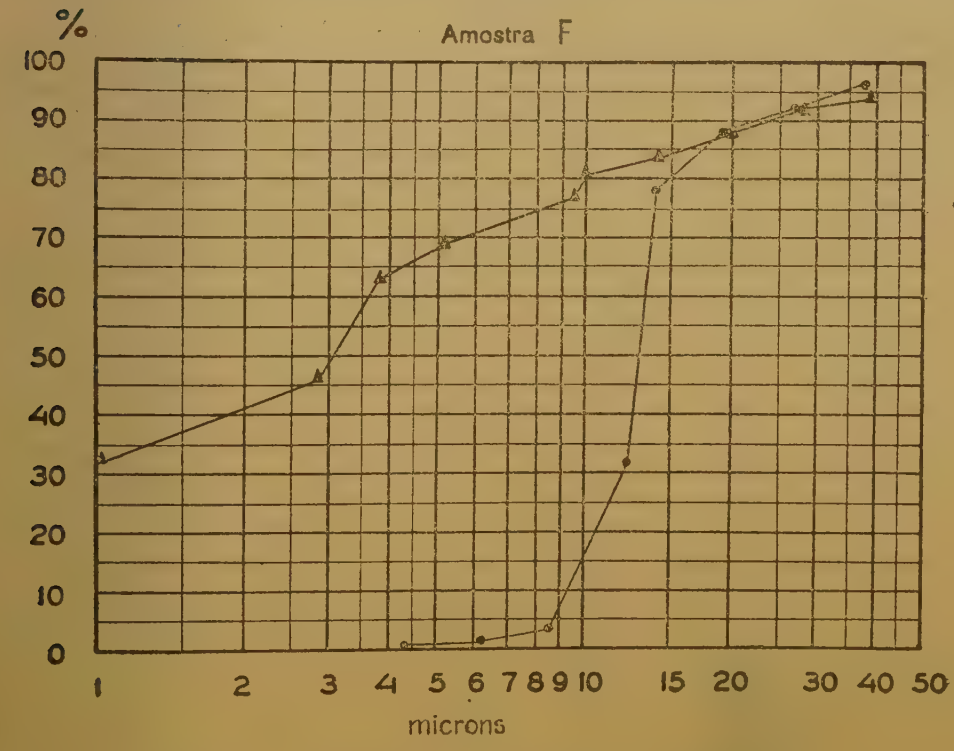


Fig. 8 — Distribuição de tamanhos da amostra F

sódio como defloculante; mas outras substâncias existem, talvez mais eficientes do que o composto acima e que serão por nós oportunamente estudadas.

A leitura dos gráficos, figs. 3 a 8, sempre na curva mais elevada, permite a obtenção de tamanhos comparativos das amostras ensaiadas. Assim os dados seguintes foram obtidos entre os limites 30 e 10, 10 e 5, e menos do que 5 microns.

TABELA 3

Porcentagem de arseniato com partículas de diâmetros entre os limites mencionados

Amostra	Entre 30 e 10 microns	Entre 10 e 5 microns	Menores do que 5 microns
A	5%	5%	88%
B	9	12	72
C	11	14	23
D	36	27	31
E	4	11	82
F	13	12	68

Para fins agrícolas, julgamos que o comportamento do arseniato na sedimentação, sem nenhuma adição de defloculante pelo analista, tem grande importância, pois mostra o produto tal como é, si bem que os diâmetros obtidos, no caso de arseniatos floculados, sejam não de partículas individuais, mas de um agrupamento delas. Mas para o conhecimento do tamanho real das partículas torna-se necessário um segundo ensaio com a mesma amostra com adição de um defloculante adequado. Dêste modo, com duas curvas, como fizemos, podemos ter uma idéia concreta do tamanho das partículas e do estado floculado ou não, do arseniato, qualidades que julgamos ter não pequena influência na eficiência dêsse produto na sua aplicação agrícola.

ADAPTATION OF THE HYDROMETER METHOD FOR THE DETERMINATION OF THE PARTICLE SIZE OF LEAD ARSENATE

Abstract

This paper deals with the application of the Stokes law to the determination of particle size of lead arsenate by means of the hydrometer method. An alignement chart was constructed to simplify the calculations.

Six samples of lead arsenate from different sources were tested by means of the described method. The results were plotted in graphs where the comparison of the distribution of particle sizes is easily done. Sodium silicate was used as a dispersing agent.

BIBLIOGRAFIA

ANÔNIMO — 1941 — Métodos de Ensaio de Solos para Fins Rodoviários. *Instituto de Pesquisas Tecnológicas de S. Paulo,* (folheto) p. 3-20.

BOUYOUCOS, G. J. (*) — 1927 — *Soil Sci.* 23: 343.

CASAGRANDE, A. (*) — 1934 — *Die Aräometer-Methode zur Bestimmung de Kornverteilung von Böden und anderen Materialen.* Julius Springer, Berlin.

HODGMAN, C. D. and H. N. HOLMES — 1941 — Viscosity and Fluidity of Water 0-100° C. *Handbook of Chemistry and Physics.* Ed.: Chemical Rubber Publishing Co., Cleveland, Ohio, p. 1634. — Smithsonian Tables compiled from various Authors. Relative Density and Volume of Water. *Idem,* p. 1606.

ODÉN, S. — 1926 — Sedimentation Analysis and its Application to the Physical Chemistry of Clays and Precipitates. *in* Alexander — *Colloid Chemistry* — Ed.: Chemical Catalog Comp., New York, p. 861-907.

SCHWEYER, H. E. — 1942 — Particle Size Studies — *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.,* 14 (8): 622-632.

STOKES, C. G. (*) — 1846 — On the theories of the internal friction of fluids in motion and the equilibrium and motion of elastic solids. *Phil. Mag.* 29: 60-62; *Cambr. Phil. Soc. Trans.* 8: 287-319 (1849); 9: 8 (1856).

(*) Não consultado o original.

Vol. 15 — Art. 7 Setembro de 1944

QUOCIENTE DE OXIDAÇÃO DO ÁCIDO LÁTICO NAS DIVERSAS PARTES DO ENCÉFALO DE MAMÍFERO

POR

P. E. Galvão, J. Pereira e J. Papaterra Limongi

Do Instituto Biológico de S. Paulo

Com 1 figura no texto

Suma importância tem sido dada à noção introduzida por MEYERHOF (9) de que o ácido lático acumulado no músculo pela sua atividade ou a êle adicionado, não se oxida senão em parte, sendo o restante resintetisado para glicogenio.

De fáto a relação $\frac{\text{ácido lático consumido}}{\text{ácido lático oxidado}}$, o denominado quociente de oxidação do ácido lático, assume para o músculo valores que variam habitualmente entre 3 e 6, podendo porém ser encontrados valores ainda mais afastados.

Ao passo que êsse quociente tem sido, quanto ao músculo, objeto de estudo por parte de numerosos pesquizadores, a sua determinação para o tecido nervoso só por poucos tem sido investigada, nem sempre com técnicas muito exatas.

WARBURG, POSENER e NEGELEIN (10) encontraram, em algumas experiências, um valor de 4,8 na substância cinzenta do cérebro de rato.

HOLMES e ASHFORD (7) e ASHFORD e HOLMES (1) empregaram nas suas experiências 2-3 gramas de cérebro picado de coelho em 3 cc de Ringer tamponado com fosfato, medindo o consumo de 0_2 em grandes aparelhos de Barcroft e determinando o consumo de ácido lático quimicamente pelo método de FRIEDMAN, COTONIO e SHAFFER. Essas experiências duravam em geral de 3 a 4 horas. Os quocientes obtidos variaram de 1,4 a 5,6. Por analogia com o que ocorre no músculo, devia-se pois esperar uma sintese do lactato não oxidado, para glicogenio. Os autores porém não encontraram aumento de glicogenio no tecido nervoso.

Em publicação anterior, GALVÃO e PEREIRA (5) determinaram pela primeira vez o quociente de oxidação do ácido lático no encéfalo das aves, em suas diversas partes. O tecido nervoso era moído num gral e as determinações feitas em animais normais e beribéricos.

Em subsequentes experiências, GALVÃO, PEREIRA e PAPATERRA (6, em publicação) fizeram novas determinações usando tecido nervoso, finamente picado, de aves normais e beribéricas, encontrando então quocientes de oxidação da mesma ordem de grandeza, si bem que os consumos de 0_2 e o consumo de lactato fossem muito maiores do que nos tecidos moídos.

No presente trabalho apresentamos os resultados de experiências feitas no sistema nervoso central de mamíferos, e em que o tecido é finamente picado.

TÉCNICA

Foram empregados encéfalos de rato e coelho adultos. Logo após a decapitação isolava-se rapidamente o cérebro, istmo do encéfalo e cerebelo. Cada uma dessas partes era rápida e finamente picada com tesoura, sendo a temperatura do material e do tecido mantida a 38°. Para o coelho usou-se exclusivamente a substância cinzenta do cérebro, tirada em fatias superficiais e em seguida finamente picada.

A medida do consumo de 0_2 em 2 horas foi feita pela técnica manométrica de Warburg como está descrita em (3 e 4). Sessenta mg de tecido eram pesadas rapidamente em balança de torsão e dispersados em 1 cc de Ringer, pobre em bicarbonato; a uma outra suspensão preparada do mesmo modo, se adicionava uma quantidade conhecida de 2-5 mg de lactato de litio. A medida do consumo de 0_2 se iniciava no máximo 5 minutos após a decapitação. Pela diferença do consumo entre essas duas suspensões em 2 horas (extra-0_2) se calculava o ácido lático oxidado, usando-se para isso o fator 1,34.

O consumo do lactato se determinava verificando a diferença entre a quantidade adicionada (mais a quantidade de ácido lático préformada no tecido) e a quantidade encontrada nas cubas do aparelho de Warburg, no fim da determinação do consumo de 0_2. Para a dosagem do ácido lático, na suspensão de tecido, procedia-se à imediata desproteinisação pelo método de SCHENK, segundo o processo de LEHNARTZ (8) e a determinação do ácido lático, feita pelo método de FRIEDMAN, COTONIO e SCHAFFER, cujo rendimento e precisão foram tornados muito maiores pelas modificações por nós introduzidas (2).

Todos os dados eram calculados para 100 mgrs. de tecido úmido.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados obtidos abrangem o consumo de 0_2 sem adição (0_2-basal), com adição de lactato de litio (0_2-lactato), a diferença entre êstes 2 consumos (0_2-extra) e o quociente de oxidação do ácido lático (quociente de oxidação).

Nas tabelas 1, 2, 3 e 4 estão representados os dados numéricos obtidos respectivamente na córtex cerebral de coelho e no cérebro, istmo do encéfalo e cerebelo de rato.

TABELA 1

CÓRTEX CEREBRAL DE COELHO NORMAL

Finamente picado

Respiração e quociente de oxidação do ácido lático.

(em 2 horas e por 100 mg de pêso úmido)

Coelhos	O_2 - Basal (mm^3)	O_2 - Lactato (mm^3)	O_2 - Extra (mm^3)	Ácido lático Consumido (mg)	Quociente de oxidação
1	232,5	408,9	176,4	0,780	3,3
2	185,3	367,5	182,2	0,377	1,5
3	252,4	388,1	135,7	0,168	0,9
4	255,4	503,2	247,8	0,821	2,5
5	237,0	401,8	164,8	0,459	2,1
6	216,7	357,7	141,0	0,282	2,0
7	196,2	381,8	185,6	0,536	2,1
8	256,9	439,6	182,7	0,395	1,6
Média	229,0	406,0	177,0	0,490	2,0

TABELA 2

CÉREBRO DE RATO NORMAL

Finamente picado

Respiração e quociente de oxidação do ácido lático.

(em 2 horas e por 100 mg de pêso úmido)

Ratos	O_2 - Basal (mm^3)	O_2 - Lactato (mm^3)	O_2 - Extra (mm^3)	Ácido lático Consumido (mg)	Quociente de oxidação
1	212,1	405,1	192,8	0,394	1,5
3	190,8	352,4	161,6	0,634	2,9
4	228,8	422,0	193,2	0,820	3,2
5	203,5	361,5	158,0	0,653	3,1
6	229,4	458,5	229,1	0,920	3,0
12	221,6	330,4	108,8	0,563	3,8
A	240,4	464,2	223,8	0,406	1,3
C	241,7	458,0	216,3	0,921	3,2
D	203,0	456,8	253,8	0,978	2,9
G	197,4	392,1	194,7	0,551	2,1
H	232,1	370,6	138,5	0,660	3,5
I	246,3	415,0	168,7	0,613	2,7
J	214,0	403,8	189,8	0,618	2,3
K	209,6	407,4	197,8	0,667	2,5
L	223,1	422,5	199,4	0,919	3,4
M	262,9	411,9	149,0	0,694	3,5
N	252,2	406,5	154,3	0,557	2,7
O	191,9	315,4	123,5	0.657	4,0
P	238,8	389,9	151,1	0,554	2,7
Q	278,1	488,5	210,4	0,760	2,7
R	299,1	494,6	195,5	0,952	3,6
S	280,5	465,0	184,5	0,898	3,6
Média	231,7	413,3	181,6	0,700	2,9

TABELA 3

ISTMO DO ENCÉFALO DE RATO NORMAL

Finamente picado

Respiração e quociente de oxidação do ácido lático

(em 2 horas e por 100 mg de pêso úmido)

Ratos	O_2 - Basal (mm^3)	O_2 - Lactato (mm^3)	O_2 - Extra (mm^3)	Ácido lático Consumido (mg)	Quociente de oxidação
1	182,9	397,3	214,4	0,987	3,4
2	167,6	308,3	140,7	0,688	3,6
3	135,0	253,1	118,1	0,523	3,3
4	213,5	451,4	237,9	0,755	2,4
5	157,5	257,0	99,5	0,588	4,4
6	192,2	392,7	200,5	0,910	3,3
Média	174,7	343,3	168,6	0,741	3,4

TABELA 4

CEREBELO DE RATO NORMAL

Finamente picado

Respiração e quociente de oxidação do ácido lático

(em 2 horas e por 100 mg de pêso úmido)

Ratos	O_2 - Basal (mm^3)	O_2 - Lactato (mm^3)	O_2 - Extra (mm^3)	Ácido lático Consumido (mg)	Quociente de oxidação
7	178,5	529,6	351,1	0,510	1,1
8	165,7	373,8	208,1	1,125	4,1
9	217,7	451,3	234,6	0,642	2,1
10	157,8	328,2	170,4	0,552	2,4
11	161,1	415,2	254,1	0,521	1,5
Média	176,1	419,6	243,5	0,670	2,2

Para facilitar a comparação dos diferentes dados obtidos com essas partes, elaboramos com as médias experimentais um gráfico (fig. 1).

Pelo exame dêsses dados se nota que a respiração basal do cérebro é maior que a do istmo do encéfalo e do cerebelo. Nenhuma diferença foi observada entre a intensidade respiratória da córtex cerebral de coelho e a do cérebro de rato, nem entre a do istmo e a do cerebelo, ambos de rato.

A oxidação do lactato se processa muito ativamente em todas essas partes estudadas, sendo o extra 0_2, em presença de lactato, muitas vezes da mesma ordem de grandesa que a respiração basal, sendo particularmente elevado no cerebelo.

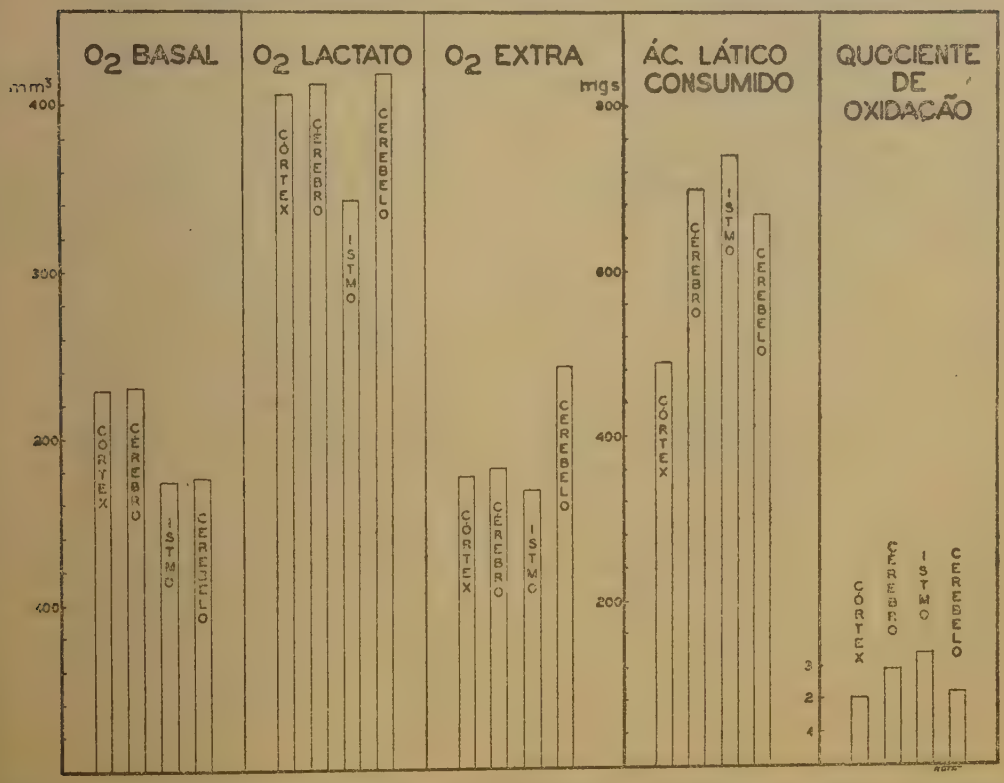


Fig. 1 — Comparação dos dados médios obtidos das diferentes partes do encéfalo.

O consumo de ácido lático, que se mostrou bastante variavel em cada uma das partes, é, em média, muito menor na córtex cerebral do coelho do que no cérebro, ao contrário do que se poderia esperar da quase identidade do extra 0_2. Aliás não ha nestas médias uma diferença de consumo entre cérebro, istmo, e cerebelo de ratos.

O quociente de oxidação por nós encontrado para todas essas partes do sistema nervoso de mamífero é bem mais constante que o encontrado por outros autores para o cérebro, e mesmo que os encontrados por MEYERHOF para o músculo esqueletico. Os nossos resultados mostram que êsse quociente é um pouco mais baixo na córtex cerebral de coelho e no cerebelo de rato do que no cérebro e no istmo do encéfalo do rato.

Apesar da constância bastante grande dos quocientes que observámos, não se encontra uma relação estrita entre o extra 0_2 pelo lactato e o consumo de ácido lático, fáto muito evidente quando se trabalha com animais em avitaminose B_1, como verificámos em outros trabalhos (5 e 6).

Esta discrepancia está-se tornando ainda mais clara em experiências que temos em andamento, consistindo na determinação do quociente em diferentes espaços de tempo.

RESUMO

Foi determinado o quociente de oxidação do ácido lático na córtex cerebral, no cérebro, no istmo do encéfalo e no cerebelo finamente picados, de coelho e rato.

As médias dos quocientes de oxidação se acham compreendidas entre 2 e 3,4.

Faz-se uma comparação entre os dados obtidos nas diversas partes do encéfalo, entre si, e com os dados obtidos por nós anteriormente.

LACTIC ACID OXIDATION QUOTIENT IN DIFFERENT PARTS OF MAMMAL BRAIN

Abstract

Finely minced nervous tissue was used. Sixty mgrs. of wet tissue were dispersed in 1 cc. of Ringer poor in bicarbonate. The O_2 uptake in 2 hours was measured by the Warburg's manometric method as already discribed (3,4) *in two suspensions one without substract* (O_2 — basal) *and the other one with addition of 2-5 mgrs. of lithium lactate* (O_2 — Lactato). *The lactate removal* (lactato consumido) *was accurately determined chemically by our modification of the permanganic-iodometric method* (2).

Determinations were made in rabbit cerebral cortex (Tab. 1) and cerebrum (Tab. 2), brain-stem (Tab. 3) and cerebellum (Tab. 4) of rats. The data are expressed per 100 mgrs. wet weight, in two hours.

The comparison is made (Fig. 1) of the mean data obtained in each of the different parts of the brain.

The basal O_2 uptake of the cerebrum is higher than that of the brain-stem (istmo do encéfalo) *and cerebellum.*

No difference was found between the respiratory rate of rabbit cerebral cortex and rat cerebrum nor between that of brain-stem and cerebellum of rats.

The oxidation of lactate proceeds very actively in all tissues.

No difference was found between the lactate removal in the cerebrum, brain-stem and cerebellum of rats. The lactate removal in the cerebral cortex was much lower than that of the cerebrum notwithstanding the very close values of their O_2 — extra.

The values of the oxidation quotient are rather constant and the average values are comprised between 2.0 and 3.4.

In agreement with our previous results (5, 6) *a very close relationship was not found between the extra O_2 and the lactic acid removal.*

BIBLIOGRAFIA

1 — Ashford, C. A. and E. G. Holmes — 1931 — Further observations on the oxidation of lactic acid by brain tissue. *Biochem. J.*, London, 25: 2028-2049.

2 — Galvão, P. E., C. H. Florence e J. Pereira — 1938 — Modificação do método permanganico-iodométrico para a dosagem do ácido lático. *Arq. Inst. Biol.*, S. Paulo, 9: 39-50.

3 — Galvão, P. E. und J. Pereira — 1936 — Über den Einfluss der Milchsäure auf die Gehirnatmung der Säugetiere bei Avitaminose B_1. *Biochem. Zeits.*, Berlin, 289: 136-142.

4 — Galvão, P. E. e J. Pereira — 1938 — Sôbre a oxidação do ácido lático no encéfalo de animais normais e em avitaminóse B_1. Localisação da lesão química nos mamíferos e nas aves. *Arq. Inst. Biol.*, S. Paulo, 9: 25-37.

5 — Galvão, P. E. e J. Pereira — 1940 — Quociente de oxidação do ácido lático no encéfalo de aves normais e em avitaminóse B_1. *Arq. Inst. Biol.*, S. Paulo, 11: 139-146.

6 — Galvão, P. E., J. Pereira e J. Papaterra Limongi — 1944 — Lactic acid oxidation quotient in minced brain of normal and avitaminotic chicken. (Em publicação).

7 — Holmes, E. G. and C. A. Ashford — 1930 — Lactic acid oxidation in brain with reference to the "Meyerhof cycle". *Biochem. J.*, London, 24: 1119-1127.

8 — Lehnartz, E. — 1928 — Zur Methodik der Bestimmung kleinster Milchsäuremengen. *Hoppe Seyler's Zeits.*, Berlin und Leipzig, 179: 1-8.

9 — Meyerhof, O. — 1930 — Die chemischen Vorgänge im Muskel und ihr Zusammenhang mit Arbeitsleistung und Wärmebildung. Ed.: Julius Springer — Berlin, 350 pp.

10 — Warburg, O., K. Posener und E. Negelein — 1924 — Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle. *Biochem. Zeits.*, Berlin, 152: 309-344.

Vol. 15 — Art. 8 Outubro de 1944

ESTUDOS SÔBRE A PESTE SUINA
I — O PAPEL DA ASSOCIAÇÃO MICROBIANA

POR

P. Bueno

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Em pesquizas anteriores relativas às lesões pulmonares conseqüentes à Peste suina (1) assinalámos como um característico do processo inflamatório pestoso, no pulmão, a intensa participação dos elementos do sistema retículo-endotelial.

Desses estudos surgiram duas questões que necessariamente deviam ser consideradas: Seria essa intensa mobilização das células retículo-endoteliais causada pela ação isolada do virus da Peste, ou provocada pelas bacterias de associação secundária? Existe uma pneumonia pestosa pura, causada apenas pelo virus da Peste, ou é ela conseqüente à ação combinada do virus e de bacterias de associação?

Por outro lado, esta última questão nos conduziu a um outro caminho de pesquizas que tem sido, apenas em parte, considerado por outros autores: a procura de conhecimentos exatos sôbre as lesões anatômicas e histopatológicas da infecção pestosa pura e da denominada Peste mista.

Este assunto foi estudado detalhadamente por WALDMANN, (2) que, em trabalhos experimentais, determinou não sómente os característicos anatomo-patológicos de casos de infecção pura e de infecção mista, como também o tempo necessário para a ocorrência espontânea da associação microbiana secundária.

Relativamente ao achado das lesões pulmonares, encontrou WALDMANN 5% de casos com lesões pneumonicas agudas nas quais a pesquiza bacteriológica foi negativa. Pelo contrário, nos animais em que foi assinalada uma associação bacteriana secundária no pulmão, a porcentagem de casos de pneumonia subiu a 23%. Nesses casos, a associação microbiana era representada principalmente pela Pasteurela, em seguida pela Salmonela e outras vezes pelo B. piocianico, pelo B. coli, por estreptococos e outras bacterias.

As verificações dêste pesquizador referentes aos casos de pneumonia independente de uma associação bacteriana secundária dão a entender que êle considerou tais achados como processos pneumonicos puros, isto é, provocados exclusivamente pelo virus da Peste. Aqui, entretanto, devemos considerar que tais verificações foram feitas anteriormente aos estudos relativos à etiologia da pneumonia gripal, o que pode ter constituido causa de confusões.

Como bem se pode compreender, os estudos diferenciais entre a Peste pura e a Peste mista não são facilmente realizaveis, em vista da tendência natural que tem a doença do virus, pura, a receber uma associação microbiana secundária. No mesmo trabalho acima citado, de WALDMANN, verifica-se, por exemplo, que já no sexto dia de doença experimental, provocada por um virus isento de contamina-

ção, 50% dos animais apresentaram a associação bacteriana secundária, enquanto, com o decorrer da infecção, se observa que a porcentagem desta contaminação se eleva rapidamente até atingir um gráo quasi absoluto nos casos de decurso mais longo. Portanto, a tentativa de obtenção de casos de Peste pura, apenas pela infecção dos animais com um virus isento de contaminação, não tem um êxito satisfatório, pois assim não se consegue impedir que a infecção secundária se estabeleça. Naturalmente, verificações seguras quanto ao verdadeiro papel da àssociação bacteriana secundária só podem ser feitas em casos de doença experimental ou espontânea, que tenham, porém, um período de evolução natural, para que assim se possam estabelecer mais precisamente os limites da ação patogênica do virus e das bacterias de contaminação, isoladamente. Assim, seria falho o sacrifício de um animal nos primeiros dias da doença, com o fito de se conhecerem apenas as alterações provocadas pelo virus, uma vez que essas lesões, certamente, estariam ainda em evolução e portanto, insuficientes para caracterizar o quadro anatomopatológico da doença.

Baseados nestes conhecimentos, tentámos impedir a associação bacteriana por meio da vacinação prévia dos animais a serem infectados, com uma vacina mista Salmonela — Pasteurela — Coli, bacterias mais frequentemente encontradas como constituindo a associação secundária, embora se conheçam as deficientes propriedades imunisantes dêstes dois ultimos microorganismos.

MATERIAL DE ESTUDO

Trabalhamos, no total, com 49 animais, sendo 14 dêles infectados experimentalmente e os 35 restantes com infecção espontânea.

A vacinação anti-associação bacteriana foi feita em 10 dos 14 animais com infecção experimental. Os 4 restantes não foram protegidos. A infecção experimental com o virus da Peste foi feita procurando-se o modo natural de contágio: parte dos animais foi colocada em pocilga contaminada e parte infectada pela ingestão de pequenos fragmentos de baço de suino morto pela doença.

Em todos os animais infectados a doença evoluiu normalmente até à morte. Os resultados obtidos pelo processo empregado demonstraram-se realmente interessantes.

Conseguimos 5 animais com hemocultura negativa e 4 outros apenas com uma muito discreta contaminação pela Pasteurela. Nos casos restantes havia infecção por Salmonela, B. Coli, Para-colon e Pasteurela; naqueles em que havia lesões pneumonicas, sempre a bacteria daí isolada correspondeu à encontrada no sangue.

Nos animais com doença espontânea houve predominância da Salmonela e da Pasteurela, quer no sangue, quer nas lesões pulmonares, sendo mais raros os casos de Peste pura.

RESULTADOS

Consideremos em primeiro lugar a questão das lesões pulmonares.

Nossas observações anatômicas e histopatológicas associadas às verificações bacteriológicas de todos os casos estudados fizeram-nos chegar à conclusão de que não existe uma pneumonia pestosa pura, isto é, um processo pneumonico provocado exclusivamente pelo virus da Peste suina.

Em todos os casos nos quais foi feito o diagnóstico anatômico ou histopatológico de "pneumonia pestosa" conseguimos sempre isolar dos fócos lesados uma bacteria. Por vêzes assinalámos uma infecção bacteriana secundária no sangue, sem haver a concomitância da pneumonia; em outros casos encontrámos apenas lesões pulmonares com a presença de bacteria, somente aí localizada, independentemente da invasão sanguínea e finalmente, freqüentes foram os casos em que se verificou a presença do germen de contaminação secundária tanto nas lesões pulmonares como no sangue. Por outro lado, em nenhum caso encontrámos um processo pneumonico seguramente de origem pestosa e bacteriologicamente esteril. WALDMANN, como já foi assinalado anteriormente, referiu a observação de casos dessa natureza; entretanto, muito provavelmente não se tratava de pneumonia pestosa, mas apenas de processos gripais aos quais se superpusera o quadro da Peste pura.

Assim, si de um lado o virus isoladamente não provoca por si só um processo pneumonico, as bacterias de associação secundária, agindo também isoladamente, ou não determinam processo pneumonico algum, ou dão desenvolvimento a processos inflamatórios, porém, com característicos diversos dos encontrados em casos de pneumonia pestosa.

A Pasteurela, por exemplo, inoculada por via intra-traqueal, no pulmão de suinos, mesmo em dóses macissas, não provoca alteração alguma, conforme nós mesmos pudemos verificar. Ao contrário, a Salmonela, quando inoculada pela mesma via, dá origem ao desenvolvimento de um processo inflamatório de aspeto caseoso. Quando em infecção espontânea, associada ao virus da gripe, determina apenas o desenvolvimento de uma discreta pneumonia, na qual se encontra histologicamente um exudato histiocitário de pequeno grau. Portanto, chegámos a esta conclusão deveras interessante: o virus da Peste, isoladamente e as bacterias de associação secundária, também agindo isoladamente, não provocam o aparecimento de um estado pneumonico semelhante ao encontrado na Peste mista. A pneumonia pestosa típica só se desenvolve pela associação do virus da Peste a certas bacterias de invasão secundária. Há então uma verdadeira ação sinérgica entre êsses elementos, ou sejam virus e bacteria.

Passemos agora a considerar os restantes achados anatomopatológicos.

Em observações anatômicas e microscópicas, conseguimos determinar nitidamente o papel do virus no desenvolvimento das alte-

rações morfológicas. A infecção pura pelo virus é responsável essencialmente pelos fenômenos hemorrágicos, fato aliás já demonstrado por outros pesquizadores. Essas hemorragias são conseqüentes a graves lesões das paredes vasculares, provocadas pelo virus e podem aparecer em quasi todos os órgãos e tecidos. Macroscopicamente, ainda na infecção pura, podem se observar apenas uma tumefação acentuada dos gânglios linfáticos, às vêzes com pequenos fócos de necróse, tumefação do baço, onde podem desenvolver-se infartos hemorrágicos, forte estáse no fígado e o aparecimento da medula óssea vermelha. Êsse é o quadro anatomo-patológico da Peste pura. Tôdas as outras lesões inflamatórias fibrinosas, difteróides ou necróticas, que ocorrem principalmente no estômago e intestino, devem ser consideradas como conseqüentes à ação combinada com os germens de infecção secundária, constituindo então o quadro da Peste mista.

Finalmente vamo-nos ocupar com um estudo sucinto da reação geral dos elementos retículo-endoteliais, questão que constituiu um dos assuntos essenciais de nossas indagações. Pudemos verificar muito nitidamente que a intensa reação dos elementos do sistema retículo-endotelial, que se observa no quadro da Peste suina, é conseqüente apenas à ação isolada do virus. A associação bacteriana secundária não desempenha nesse sentido um papel de importância. A reação dos elementos do retículo-endotelio se mostra com a mesma intensidade, quer nos casos de infecção pura pelo virus, quer nos casos de Peste mista.

Fizemos um estudo histológico sistemático dos órgãos torácicos e abdominais e dos gânglios linfáticos de suinos com Peste espontânea e experimental e é interessante notar que, excetuando-se os órgãos em que a associação bacteriana desempenha um papel importante no desenvolvimento de alterações morfológicas, como no pulmão, no estômago e no intestino, nos órgãos restantes as alterações histológicas predominam essencialmente naqueles que são ricos de elementos do retículo-endotelio, como nos gânglios linfáticos, no baço e no fígado. Nos casos de Peste pura, sem associação bacteriana secundária sanguínea ou localizada, observa-se então que apenas são gravemente lesados os órgãos acima referidos, principalmente gânglios linfáticos e baço e determinadas porções do endotelio vascular.

Em seguida, numa segunda parte do relato de nossas verificações, faremos um estudo morfológico nitidamente demonstrativo da acentuada especificidade da ação do virus da Peste sôbre os elementos do sistema retículo-endotelial.

CONCLUSÕES

Nossas verificações sôbre o papel da associação microbiana na Peste suina conduziram-nos às seguintes conclusões:

1 — A Pneumonia pestosa é provocada pela ação conjunta do virus da Peste e de certas bacterias de associação secundária. Não existe uma pneumonia de infecção pura, isto é, um processo pneumonico causado exclusivamente pela ação do virus.

2 — O quadro anatomo-patológico da Peste suina p u r a é representado apenas pelas hemorragias, que podem aparecer em quasi todos os órgãos e tecidos, pela tumefação dos gânglios linfáticos e do baço, por uma acentuada estáse no fígado e pelo aparecimento da medula óssea vermelha. Tôdas as outras lesões inflamatórias fibrinósas, difteróides ou necróticas, que ocorrem em outros órgãos, constituem sinais de uma infecção bacteriana secundária.

3 — A intensa reação dos elementos do sistema retículo-endotelial, observada histologicamente em casos de Peste suina, é conseqüente à ação isolada do virus. Não há interferência da associação microbiana secundária no desenvolvimento dessa reação.

STUDIES ON SWINE FEVER
I — THE RÔLE OF ASSOCIATED BACTERIA

A b s t r a c t

This paper deals with researches on the rôle played by the bacteria which usually are associated to the virus in swine fever.

The most important questions requiring an answer are the following:

a) Is there a pure swine fever-pneumonia produced exclusively by the virus, or is the lung process a consequence of a interaction of the virus and the bacteria usually associated with it?

b) Are the pathological pictures of the pure swine fever and that of the mixed swine fever the same?

c) Is the strong reaction of the reticulo-endothelial system observed in swine fever consequent to the action of the virus only or to the action of the bacteria of secondary association?

We came to the following conclusions:

1 — Swine-fever pneumonia is produced by the association of the virus with certain bacteria. There is not a pure swine fever pneumonia, i. e, an inflammatory process of the lungs caused exclusively by the virus.

2 — The pathological picture caused by the virus without association of bacteria is represented by hemorrhages, tumefation of the lymph nodes and the spleen (sometimes with infarcts), strong congestion of the liver and reddening of the bone marrow. All other inflammatory lesions (fibrinous, diphteroid or necrotic) occurring in this disease results from secondary bacterial infections.

3 — The intense reaction of the reticulo-endothelial cells observed in swine fever is consequent to the action of the virus. Bacteria of secondary infection do not interfere with this reaction.

BIBLIOGRAFIA

BUENO, P. — 1941 — O diagnóstico histológico da Peste suina, com referência especial às alterações pulmonares. *Arq. Inst. Biol.*, S. Paulo, 12: 283-296.

WALDMANN — 1930 — Le diagnostic de la peste porcine. *Bull. Off. Internat. Epizooties*, 3: 737-752.

ESTUDOS SÔBRE A PESTE SUINA
II - A REAÇÃO DO SISTEMA RETÍCULO-ENDOTELIAL

POR

P. Bueno

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com as estampas 5-8

Nossas verificações sôbre a reação do sistema retículo-endotelial na Peste suina (*) conduziram-nos a dois conhecimentos básicos, que vêm demonstrar de maneira bem clara o modo de ação do agente essencial da doença, o virus filtrável, na gênese das alterações morfológicas:

1 — A intensa participação dos elementos do retículo-endotelio, observada no quadro histológico da Peste suina, é conseqüente exclusivamente à ação isolada do virus;

2 — As alterações histológicas encontradas em casos de Peste pura, isto é, sem associação bacteriana, são representadas a p e n a s por uma acentuada reação do sistema retículo-endotelial. Essa reação se demonstra com particular intensidade nos gânglios linfáticos, no baço e em grau menos apreciável, no figado e em outros órgãos.

*

* *

Nós fizemos um estudo histológico dos órgãos torácicos e abdominais de suinos com a doença espontânea e experimental, com ou sem associação bacteriana secundária. Nessas verificações ocupamo-nos essencialmente com o estudo dos órgãos ricos em elementos do S.R.E.: gânglios linfáticos, baço, fígado, medula óssea e supra-renal, pois, nossas observações de conjunto nos haviam chamado a atenção para o fato muito significativo, talvez ainda não lembrado, da existência de uma ação e s p e c í f i c a do virus da Peste sôbre tais elementos. Na realidade é interessante considerar que, em todo o quadro histológico da Peste, se observam, particularmente, alterações de mobilização ou alterações regressivas e proliferativas das células pertencentes ao sistema retículo-endotelial. Tôdas as outras lesões assinaladas nada mais representam que alterações conseqüentes àquelas, ou lesões provocadas por uma infecção bacteriana secundária.

Passamos agora a considerar os achados histológicos dos órgãos estudados, nos quais se demonstra a reação retículo-endotelial como

(*) Arq. Inst. Biol., S. Paulo, 1944. 15: 81-86.

única lesão morfológica conseqüente à infecção pestosa. Em primeiro lugar, referiremos as observações de outros pesquizadores, para, em seguida, considerar as nossas verificações, que foram feitas em 25 animais, com doença espontânea ou experimental.

GÂNGLIOS LINFÁTICOS

A histologia dos gânglios linfáticos na Peste suina foi bem estudada por NIEBERLE (3), RÖHRER (4) e SEIFRIED e CAIN (7).

O primeiro pesquizador considerou assencialmente as alterações hemorrágicas dêstes órgãos, chegando à conclusão de que os acumulos de hemacias em determinadas regiões dos gânglios não significavam a ocorrência de hemorragias locais, mas seriam tão sómente consequêntes a uma resorpção de sangue oriundo de hemorragias ocorrendo em outros órgãos ou tecidos visinhos. Por outro lado NIEBERLE assinalou ter verificado, às vezes, apenas discretas alterações do tecido linfático do gânglio, observando, porém, na maioria dos casos, uma hiperplasia linfática difusa, associada ao desaparecimento dos centros germinativos dos folículos.

RÖHRER ocupou-se mais detalhadamente com o estudo da reação do tecido próprio dos gânglios. Assinalou, em contraposição às observações de NIEBERLE, um forte aumento das células reticulares, com clareamento do parenquima, observando apenas fócos isolados de hiperplasia linfática. Notou também o fáto, muito significativo, da existência de lesões vasculares como causa das hemorragias parenquimatosas. Finalmente referiu-se à dilatação dos espaços linfáticos perivasculares e à hiperplasia das células adventiciais.

SEIFRIED e CAIN classificaram as lesões histológicas dos gânglios linfáticos em três tipos.

Como constituindo o primeiro tipo, consideraram êles os casos com lesões discretas do parenquima. Assinalam a ocorrência de sinais de proliferação do retículo e edema intersticial, com deposição de fibrina. Entre outras alterações que ocorrem irregularmente, referem as infiltrações perivasculares nos espaços pobres de células, necróse perivascular, tumefação e degeneração das células reticulares, aumento de eosinófilos e hiperplasia local do tecido linfóide. Observaram, além disso, aumento de tamanho dos folículos e dos centros germinativos, que, apareciam porém diminuidos em número. Nas trabéculas e na cápsula notaram apenas edema e em algumas áreas, infiltração perivascular por linfocitos e histiocitos.

Como lesões do segundo tipo notaram essencialmente os fenômenos hemorrágicos que aparecem com intensidade principalmente nas regiões pobres de células. Essas hemorragias são consequêntes a graves lesões das paredes vasculares, representadas de início por tumefação e proliferação das células endoteliais, seguida de lesões regressivas, culminando pela necróse. As outras alterações assinaladas são as mesmas referidas no estudo do primeiro tipo.

Finalmente as lesões do terceiro tipo seriam as do estadío final dos fenômenos hemorrágicos, que podem provocar a atrofia do tecido linfóide por compressão.

Passemos agora às nossas verificações:

Consideramos as lesões histológicas primárias dos gânglios linfáticos apenas como lesões regressivas ou proliferativas dos elementos retículo-endoteliais. Observemos êsse fato, pelo estudo das alterações morfológicas orientadas nesse sentido.

Pudemos verificar que uma das lesões primárias e essenciais que ocorre nos gânglios linfáticos, em casos de Peste suina, é a morte das células dos centros germinativos dos folículos linfóides. O exame minucioso dêsses centros revela um grande número de células em vários estadíos da necrobióse ou já em completa desintegração (Estampa 5, fig. *A*). A fase final é representada pelo desaparecimento total do centro germinativo do folículo. Êste fato explica, pois, a acentuada hipoplasia do tecido linfóide que se observa em quasi todos os casos, e que, finalmente, chega à aplasia linfática completa em extensas áreas do gânglio. Portanto, o que se verifica inicialmente é o desaparecimento dos folículos linfóides e em seguida o conseqüente desaparecimento das células linfocitárias.

Como seqüência ou talvez em concomitância com êste processo de aplasia do tecido linfóide se desenvolve uma proliferação das células retículo-endoteliais, às vêzes com particular intensidade. Esta proliferação reticular se dá em áreas extensas, chegando a atingir todo o gânglio.

O estudo destas células reticulares proliferadas é devéras interessante. Elas se apresentam com características diversas, constituindo dois tipos distintos. O primeiro é representado por células grandes e claras, com núcleo grande, globoso ou em forma de feijão, vesiculoso, claro, com um ou dois nucleólos, sendo um dêles bem visível e com citoplasma pálido, bem desenvolvido e de limites imprecisos e mal definidos. Estas células aparecem, em geral, coladas às paredes dos seios linfáticos e mais raramente descamadas para o seu interior. São encontradas também no interior dos vasos sanguíneos e nos espaços linfáticos. Tem-se a impressão de que êsses elementos são células jovens recentemente proliferadas (Estampa 5, fig. *B*). O segundo tipo é representado por células geralmente menores que as anteriores, arredondadas, de tamanhos diversos e que se mostram bem coradas. Os núcleos são arredondados ou em forma de feijão e aparecem intensamente corados, mal deixando perceber o nucleólo; o citoplasma é menos desenvolvido que o dos elementos anteriormente descritos e tem limites bem definidos. Apresentam-se sempre dentro dos seios linfáticos; aparecem no interior dos vasos sanguíneos e também nos espaços linfáticos perivasculares. São típicos monocitos.

Ainda com relação a êste fenômeno da proliferação das células retículo-endoteliais, é interessante notar também que ela apresenta dois quadros um tanto diversos. Em muitos casos se observa que os elementos reticulares proliferam densamente, conduzindo à formação

de um tecido de aspeto sólido, havendo pequena descamação celular. Em outros, ao contrário, a descamação é muito intensa, não se verificando assim a presença de áreas de densificação do tecido. Naturalmente, entre êsses dois quadros se observa uma série de aspetos intermediários, com maior ou menor acentuação desta ou daquela característica.

Freqüentemente foi observada a presença de numerosas figuras de mitóse, indicativas da reação acentuada do S.R.E.. De outro lado, em alguns casos, verificámos o aparecimento de gigantocitos no seio do tecido proliferado. Estas células se apresentavam com vários núcleos arredondados, em geral pouco corados, freqüentemente justapostos uns aos outros e com citoplasma claro e mal delimitado (Estampa 6, fig. *C*).

Consideremos agora as lesões vasculares.

Em numerosos capilares e arteríolas, principalmente nas zonas pobres de células, se observa uma acentuada tumefação e descamação das células endoteliais, para o interior dos vasos. Estas alterações constituem freqüentemente a fase inicial de um processo degenerativo da parede vascular que culmina por hialinização ou necróse. Freqüentemente, nestes vasos, formam-se trombos, às vêzes parciais, outras vêzes totais, conduzindo ao aparecimento de hemorragias e fócos de necróse no tecido circunvisinho. Ao passo que êsses fenômenos regressivos das paredes dos vasos são observados com muito constância nas zonas pobres de células, em outros pontos do parenquima aparecem, no entanto, vasos nos quais apenas se notam fenômenos proliferativos. Temos a impressão de que, nesses vasos, as lesões não chegam à fase regressiva. Nota-se aí uma acentuada proliferação das células endoteliais que, freqüentemente, descamam para a luz do vaso, apresentando característicos semelhantes aos das células reticulares recentemente proliferadas. Em geral têm elas um núcleo muito pobre de cromatina e citoplasma claro e mal delimitado. (Estampa 6, fig. *D*). Estas células devem ser consideradas como elementos pertencentes ao sistema retículo-endotelial.

Em suma, são essas as únicas lesões dos gânglios linfáticos, provocadas pela ação do virus da Peste. Como vimos, essas alterações interessam apenas as células do retículo e as células endoteliais de certos vasos. Os fenômenos hemorrágicos, o edema e a necróse de áreas às vêzes extensas do parenquima, constituem apenas manifestações secundárias a uma lesão primária, essencial, das paredes vasculares, principalmente das tromboses, que, além de favorecerem as hemorragias e o desenvolvimento do edema, são responsáveis

pelo desenvolvimento das áreas de necróse. A associação bacteriana, também secundária, pode aumentar ainda mais a intensidade dessas alterações.

BAÇO

David e Schwarz (2), Röhrer, bem como Seifried e Cain estudaram detalhadamente as lesões que ocorrem no baço em consequência da infecção pestosa. Êsses pesquizadores se ocuparam essencialmente com o estudo dos infartos e das necróses que se desenvolvem com relativa frequência nesse órgão e que são consequentes às trombóses vasculares.

Interessa-nos, principalmente, o estudo das lesões por êles encontradas nas regiões do parenquima, distantes das zonas de infarto. Assinalaram, de uma maneira geral, um forte aumento das células da polpa, hiperemia e hemorragias perivasculares e acentuada aplasia dos folículos, muitos dos quais apareciam com focos necrobioticos. As lesões vasculares foram as mesmas já assinaladas por ocasião do estudo dos gânglios linfáticos.

Nós nos ocupamos apenas com o estudo dessas alterações, pois os infartos constituem tão somente lesões secundárias que ocorrem em conseqüência de lesões primárias das paredes vasculares.

Semelhantemente ao que assinalámos por ocasião do estudo dos gânglios linfáticos, as lesões primárias que se desenvolvem no baço são também puras alterações dos elementos do S.R.E..

Em quasi todos os casos se nota uma acentuada proliferação e descamação das células das paredes dos seios venósos. Estas células se acumulam principalmente nos seios peritrabeculares e aparecem também, em grande número, nas ramificações da veia esplênica. (Estampa 7, fig. *E*). Tais elementos são semelhantes aos assinalados nos gânglios linfáticos. Observamos, ora células grandes, com núcleo globoso, claro e com um ou dois nucleólos, sendo um dêles bem visível, e citoplasma claro e em geral mal delimitado, ora elementos de tamanhos variáveis, com núcleo rico de cromatina, arredondado ou em forma de feijão e com citoplasma bem corado e bem delimitado. Sem dúvida alguma essas células têm idêntica origem, porém, apresentam-se em fases diversas de desenvolvimento.

Em alguns casos foram encontradas figuras de mitóse.

Neste órgão desenvolve-se também, com particular intensidade, a aplasia dos folículos linfóides, conseqüente à morte dos elementos germinativos. Êstes aparecem freqüentemente nas várias fases da necrobióse e não raro, completamente desintegrados. Assim, em casos de decurso mais prolongado nota-se o desaparecimento quasi completo dos elementos linfóides no parenquima do órgão.

As lesões das paredes vasculares são idênticas às assinaladas nos gânglios linfáticos. São freqüentemente lesadas as arterias penicilares, nas quais se nota hialinização das paredes e descamação endotelial.

De particular interêsse são as perturbações circulatórias observadas na polpa. Há casos em que se observa apenas uma estáse acentuada e hemorragias. Em outros nota-se uma paralisia total dos seios venósos, que aparecem extremamente dilatados e cheios de sangue. As hemorragias peri ou endofoliculares, já assinaladas por RÖHRER e SEIFRIED e CAIN, são alterações também muito significativas e relativamente constantes. Ora aparecem nítidas hemorragias no espaço perifolicular, ora também no próprio folículo ou no local onde êste existiu e não raramente, com marcada intensidade. Estas perturbações circulatórias são, entretanto, de origem puramente mecânica, secundárias às lesões essenciais das paredes vasculares.

Assim, relativamente às lesões assinaladas no baço, chega-se também à conclusão final de que, em essência, a ação do virus da Peste neste órgão se faz sentir unicamente sôbre os elementos do sistema retículo-endotelial.

FÍGADO

As alterações histológicas do fígado foram ainda estuadas por RÖHRER (5) e SEIFRIED e CAIN, que descreveram apenas discretas alterações neste órgão.

RÖHRER assinalou, em raros casos, uma degeneração parenquimatosa e gordurosa de pequeno gráo, particularmente nas porções centrais dos lóbulos. Como outras lesões observadas, notou: tumefação das células endoteliais dos vasos, principalmente das células de KUPFFER, acentuada hiperemia nos sinusóides e nas veias centrais e a presença de massas hialinas no interior dos vasos. Em casos de Peste com associação bacteriana, a ocorrência das degenerações parenquimatosa e gordurosa se demonstrou mais frequente. Nestes casos verificou ainda o aparecimetno de pequenos focos leuco-histiocitários no parenquima e uma infiltração celular nos espaços porta.

Em suas pesquizas, SEIFRIED e CAIN assinalaram apenas lesões vasculares, hemorragias, infiltração mononuclear nos intersticios e em um único caso, necróse de parte de um lóbulo.

Nossa observações histológicas coincidem com as verificações dêsses autores. No entanto, devemo-nos referir, principalmente, à reação retículo-endotelial que, na realidade, constitui, também neste órgão, o único substrato morfológico representativo da ação do virus da Peste. As outras discretas alterações degenerativas das células hepáticas, observadas apenas em raros casos, são certamente secundárias aos outros fenômenos patológicos iniciais.

A reação do retículo-endotelio no fígado se demonstra por três tipos de lesões observadas, com relativa freqüência, nos casos de Peste: a tumefação e descamação das células de Kupffer, a infiltração histiocitária intersticial e os fócos de infiltração histiocitária no parenquima.

Consideremos cada uma destas lesões isoladamente.

A tumefação e a descamação das células de Kupffer representa, semelhantemente ao verificado em outros órgãos, o resultado da irritação dêsses elementos pelo virus da Peste. Essas células irritadas se tumefazem e descamam para o interior dos sinusóides e algumas vêzes tal irritação atinge um grau acentuado.

Podem-se observar, no interior dos capilares e das veias centrais, essas células descamadas que se apresentam com característicos variáveis e em essência, semelhantes aos assinalados por ocasião do estudo dos outros órgãos. (Estampa 7, fig. *F*).

As células recentemente proliferadas e descamadas se mostram com núcleos pobres de cromatina e com um ou dois nucleólos e citoplasma pálido e mal delimitado. Raras vêzes se encontram êsses mesmos elementos, porém, de tamanhos gigantes, podendo ocupar tôda a luz do sinusóide. Mais freqüentemente observam-se células de tamanhos variáveis, com núcleos mais escuros, arredondados ou em forma de rim e citoplasma bem corado, com limites precisos. São elementos já evoluidos e maduros. Encontra-se ainda um terceiro tipo de célula com núcleo pequeno, muito rico de cromatina e com citoplasma às vêzes muito pouco desenvolvido, outras vêzes mais aparente, ora bem delimitado, ora com limites mal definidos. São as células de Kupffer ainda em fase de repouso.

Além dessas células foram observados outros elementos nitidamente significativos do processo de reação do retículo endotelio, representado pelas mitóses, que apareciam com certa freqüência no interior dos sinusóides, às vêzes pelas figuras de eritrofagocitóse e mais raramente, pelos gigantocitos formados por células endoteliais proliferadas e que se demonstravam com núcleos superpostos e com citoplasma pouco desenvolvido.

A infiltração histiocitária dos espaços porta em alguns casos é nula, enquanto, em outros, se demonstra nitidamente acentuada. As células que se infiltram nestes espaços interlobulares são de idêntica natureza das acima descritas, naturalmente, com diferenciação de certos característicos, pois já adquiriram as funções de células migrantes. Mostram ora núcleos globosos e pouco ricos de cromatina, ora núcleos muito escuros e muito polimórficos.

(Estampa 8, fig. *G*). Entre êstes elementos não é raro observarem-se figuras de mitóse.

Finalmente vamo-nos ocupar com os fócos de infiltração histiocitária, às vêzes encontrados no parenquima. RÖHRER admite que tais fócos são originários da ação das bacterias de associação secundária. Embora provavelmente seja exata essa asserção, em nossas pesquizas observamos êsses fócos miliares de infiltração histiocitária em casos nos quais a prova bacteriológica foi negativa. Por outro lado, em alguns casos, verificámos a presença de colonias bacterianas nas porções centrais dos fócos, o que vem de encontro à idéia daquele pesquizador.

Êsses infiltrados histiocitários (Estampa 8, fig. *H*) aparecem disseminados em todo o parenquima, nas porções mais centrais dos lóbulos ou junto aos espaços porta. Às vêzes se apresentam como infiltrados miliares e outras vêzes como submiliares. Formam-se em conseqüência de uma necróse primária do parenquima, seguida de posterior infiltração por células histiocitárias que têm característicos idênticos aos das células que se infiltram nos espaços interlobulares. Nos centros dêsses fócos, às vêzes se observam pequenas hemorragias.

MEDULA OSSEA

As lesões histológicas da medula óssea são, em geral, de pequeno grau. Em um único caso encontramos uma acentuada proliferação das células retículo-endoteliais. Em todos os outros casos estudados apenas assinalámos uma discreta proliferação dêsses elementos. Essas células aparecem em pequenos conglomerados e se apresentam como elementos indiferenciados, com grandes núcleos globosos e pobres de cromatina e com citoplasma pálido e de limites imprecisos.

As hemorragias são muito constantes.

SUPRA-RENAL

Neste órgão se observa também a reação dos elementos retículo-endoteliais, representada pela tumefação e descamação das células endoteliais dos sinusóides. As células recentemente descamadas são claras e têm citoplasma com limites imprecisos, enquanto os elementos mais evoluidos aparecem bem corados e com citoplasma bem delimitado. Não observámos lesões parenquimatosas.

OUTROS ÓRGÃOS

Se considerarmos os achados histológicos de todos os órgãos restantes, chegamos à conclusão de que as alterações aí assinaladas constituem, apenas, ou lesões conseqüentes à associação bacteriana

secundária, como é o caso do pulmão, do estômago e do intestino, ou alterações vasculares de idêntica significação das assinaladas nos órgãos anteriormente estudados, ou ainda certas reações inflamatórias, como as encontradas no coração e no cérebro, onde se observam infiltrados constituidos também por elementos do sistema retículo-endotelial.

CONCLUSÕES

As considerações que fizemos acêrca da participação dos elementos retículo-endoteliais no quadro histológico da Peste suina constituem o resultado das nossas verificações e permitem chegar-se à conclusão de que o substrato morfológico decorrente da ação do virus da Peste sôbre o organismo é representado exclusivamente pelos sinais da reação do retículo-endotelio.

Podemos pois concluir que a Peste suina é uma doença do sistema retículo-endotelial.

STUDIES ON SWINE FEVER
II — THE REACTION OF THE RETICULO-ENDOTHELIAL SYSTEM

Abstract

Histological researches in combination with bacteriological observations revealed that (a) the intense participation of the reticulo-endothelial elements observed in the histological picture of swine fever is caused exclusively by the action of the virus, and (b) the histological lesions encountered in pure swine fever (without bacterial association) are represented only by the reaction of the reticulo-endothelial system. This reaction occurrs with particular intensity in the lymph-nodes, the spleen and the liver and more slightly in the bone marrow and in the adrenals.

The alterations observed in these organs are studied in detail and have shown that the primary lesions are located in the reticulo-endothelium, while, other lesions, as hemorrhages and necrosis are secondary manifestations of the disease.

The verifications lead to the final conclusion that swine fever is a disease of the reticulo-endothelial sistem.

BIBLIOGRAFIA

1 — Cain, C. B. and O. Seifried — 1932 — Histological Studies on Hog Cholera. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, **33**: 225-228.

2 — David, W. und M. Schwarz — 1930 — Untersuchung über Virusschweinepest. *Arch. Tierheilk.*, **62**: 315.

3 — NIEBERLE, K. — 1930 — Über das Wesen und die diagnostische Bedeutung der Lymphknotenveränderungen bei der akuten Schweinepest. *Berl. Tierärztl. Wschr.*, 46: 717-721.

4 — RÖHRER, H. — 1932 — Histologische Untersuchungen bei Schweinepest. I — Lymphknotenveränderungen in akuten Fällen. II — Veränderungen im Zentralnervensystem in akuten Fällen. *Arch. Tierheilk.*, 1931, 62: 345; 439. III — Veränderungen der Milz in akuten Fällen unter besonderer Berücksichtigung der Milzinfarkte. *Arch. Tierheilk.*, 64: 125-143.

5 — RÖHRER, H. — 1932 — Pathologisch-anatomische und histologische Studien bei akuter Schweinepest, insbesondere an Leber und Niere. *Virchow's Archiv*, 284: 203-230.

6 — SEIFRIED, O. — 1932 — Zur Histologie und histologischen Diagnostik der Virusschweinepest. *Münch. Tierärztl. Wschr.*, 83: 244-249.

7 — SEIFRIED, O. and C. B. CAIN — 1932 — Histological Studies on Hog Cholera. II —Lesions of the Vascular System. III — Lesions in the various Organs. *J. Exp. Medicine*, 56: 345-349 e 351-362.

8 — SEIFRIED, O. und H. HERBSTREITH — 1934 — Zur Frage der diagnostischen Bedeutung der Lymphknotenveränderungen bei akuter Schweinepest. *Berl. Tierärtzl. Wschr.*, 50: 230-232.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Estampa 5

Fig. *A* — Gânglio linfático. Centro germinativo de um folículo linfoide. Numerosas células em necrobióse. (Aum. 400 ×).

Fig. *B* — Gânglio linfático. Células retículo endoteliais recentemente proliferadas. (Aum. 900 ×).

Estampa 6

Fig. *C* — Gânglio linfático. Gigantocitos. (Aum. ca. 600 ×).

Fig. *D* — Gânglio linfático — Vaso sanguineo. Notar a proliferação e a descamação das células endoteliais. (Aum. 600 ×).

Estampa 7

Fig. *E* — Baço — Vários tipos de células entre as quais numerosos elementos retículo-endoteliais encontrados numa veia esplênica. (Aum. 600 ×).

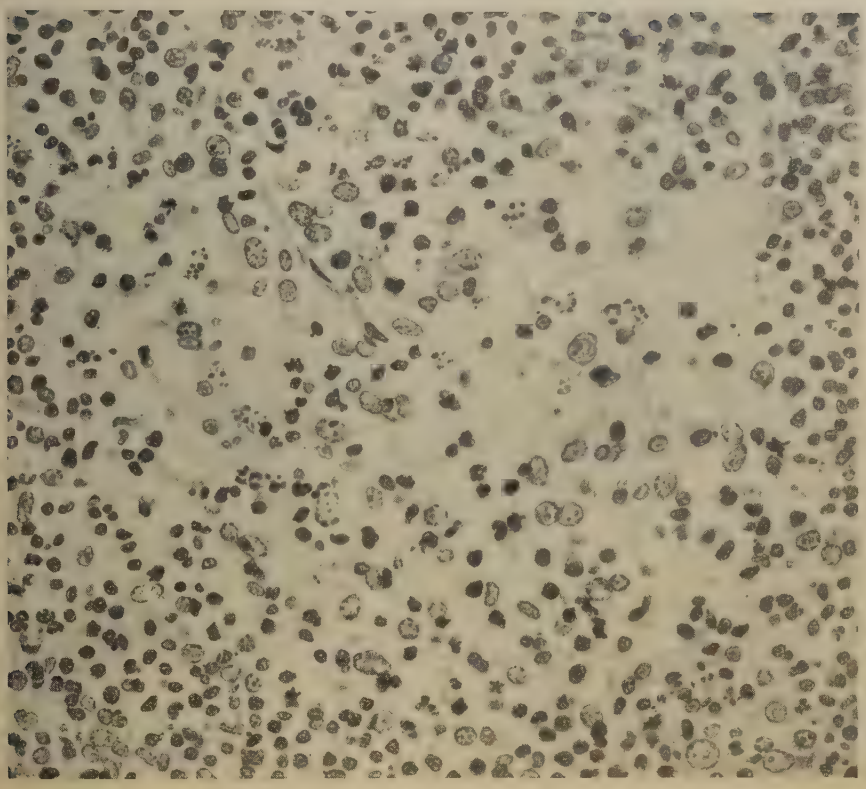
Fig. *F* — Fígado — Descamação das células de Kupffer. (Aum. 750 ×).

Estampa 8

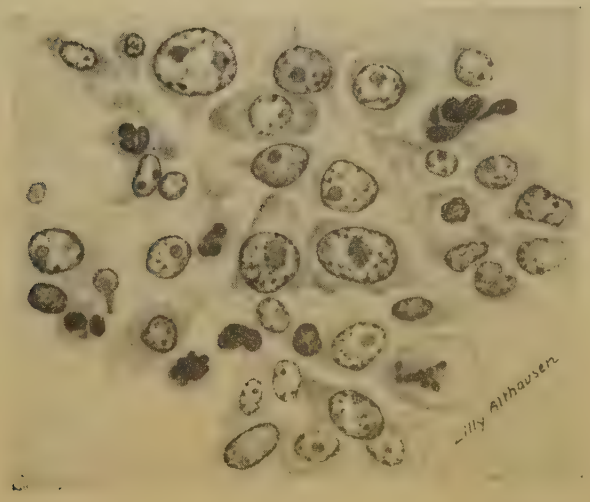
Fig. *G* — Fígado — Infiltração histiocitária no espaço porta. (Aum. ca. 280 ×).

Fig. *H* — Fígado — Necróse miliar com infiltração histiocitária. (Aum. 400 ×).

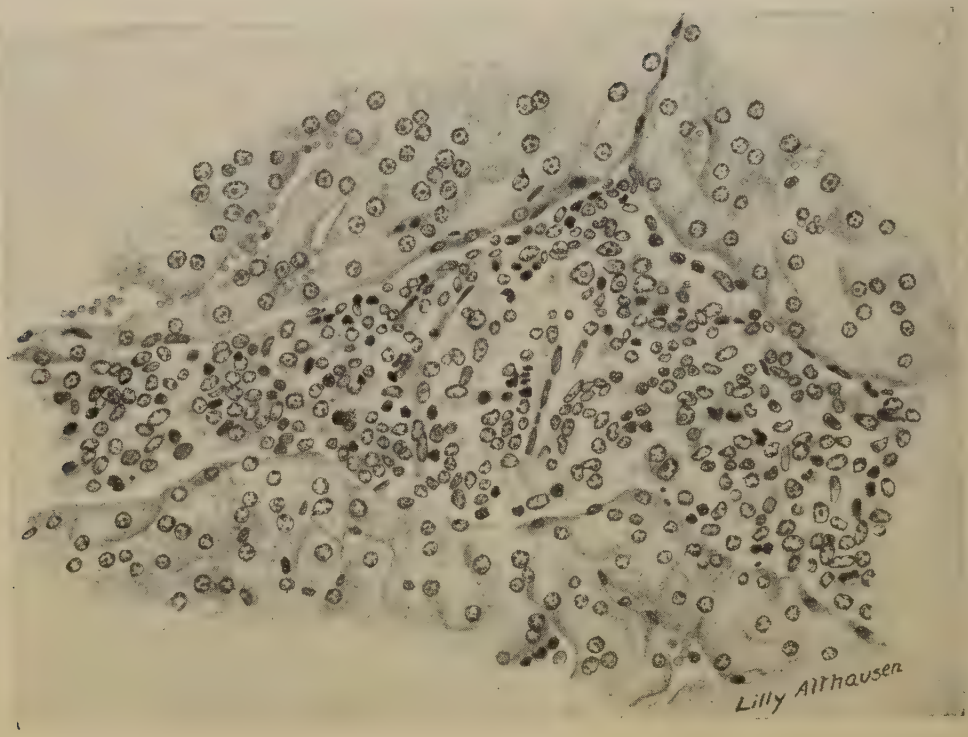
(Desenhos de Lilly Althausen)



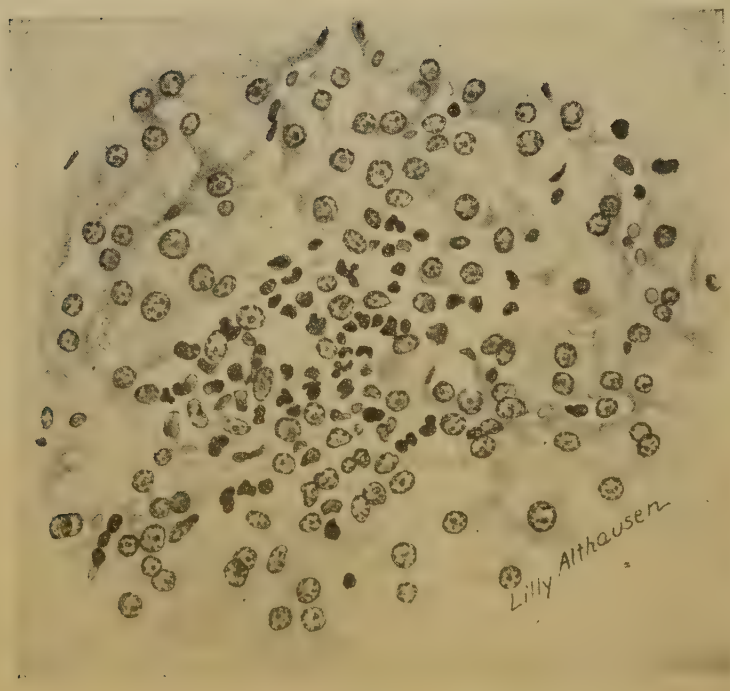
A



B



G



H

Vol. 15 — Art. 10 Outubro de 1944

ALGUMAS OBSERVAÇÕES SÔBRE O MECANISMO DA ACUMULAÇÃO DO "NICOTIANA VIRUS 1 (MAYER) ALLARD" EM FÔLHAS DE FUMO

POR

K. Silberschmidt e H. Lopez Torres (*)

Do Instituto Biológico de S. Paulo

Com 6 figuras no texto e estampas 9-10

Pretendemos apresentar, neste trabalho, algumas observações relativas ao processo da multiplicação do virus do mosáico comum do fumo (*Nicotiana* - virus 1) em fôlhas dessa espécie, e também a respeito da influência que a concentração do inóculo exerce no caráter dos sintomas das plantas infeccionadas.

Visamos principalmente com êstes estudos chegar a uma melhor compreensão da relação existente entre o teôr de virus do inóculo e o título final que êsse mesmo virus atinge na planta inoculada.

Desde já é necessário esclarecer que usaremos neste trabalho, às vêzes, os têrmos "multiplicação" ou "acumulação" do virus para nos referir ao aumento da sua atividade patogênica. Julgamos justificada esta simplificação na terminologia em virtude de ser a atividade do virus uma qualidade preponderante na caracterização de qualquer dos seus efeitos.

Antes de HOLMES (3, 1929) e STANLEY (15, 1936) terem desenvolvido métodos exatos para determinar e comparar diversas concentrações de virus, as afirmativas sôbre o provável teôr de virus em plantas tinham que basear-se quase unicamente no quadro sintomatológico das plantas atacadas. Foi devido a êsse fato que muitos autores já tentaram averiguar se a severidade de sintomas sistêmicos de uma planta atacada por uma doença de virus pode ser considerada como expressão da concentração do virus na planta, e se as plantas inoculadas com um virus em baixa concentração tendem a apresentar sintomas mais brandos do que as infeccionadas com o mesmo virus em concentrações mais altas.

Muito pequenas e pouco elucidativas foram, porém, as diferenças na severidade dos sintomas encontradas por êstes autores entre plantas inoculadas com diversas diluições do mesmo virus. Analisando

(*) Trabalho de colaboração, executado durante o estágio dêste agrônomo da "Escola Superior de Agricultura Tropical" de Cali, Colômbia, na Secção de Fisiologia Vegetal.

esta questão, McKINNEY (6, 1927, p. 18), por exemplo, chegou à seguinte conclusão:

"It was soon observed, that the type of mosaic symptoms occurring on the plants inoculated with the virus in different concentrations varied so little, and these variations were so inconsistent or so difficult to measure accurately, that this factor could not be used to advantage in quantitative studies".

Coincide também com essas conclusões a referência de BAWDEN (1, 1939, p. 21) ao mesmo assunto.

Assim os pesquisadores se acostumaram à admitir que a concentração do inóculo não exercia uma nítida influência na severidade dos sintomas. A maioria dos autores, ainda hoje em dia concorda com essa suposição, como se pode ver do resumo da literatura em KAUSCHE (4, 1937).

A aceitação quase total dessa teoria conduziu certamente muitos pesquisadores à sub-estimar também a influência que a concentração de virus do inóculo exerce no teôr final que êsse mesmo virus alcança na planta inoculada.

Essa opinião, apesar de ter surgido nos primeiros tempos da virologia, sobreviveu até a época atual em que já se pode dispor de métodos biológicos e químicos para a determinação exata das diversas concentrações de virus. Indiretamente, a descoberta de STANLEY, de uma nucleoproteina dotada das qualidades de virus, e a teoria da multiplicação autocatalítica do virus na planta em conseqüência de uma perturbação do metabolismo normal (STANLEY, 14 e 17, 1935 e 1939), contribuiram mesmo para se sub-estimar ainda mais a influência que a concentração do inóculo exerce no teôr final do virus no organismo. Isso porque os defensores mais extremados dessa teoria da multiplicação autocatalítica do virus no organismo entendiam que qualquer concentração do inóculo (dentro dos limites de eficiência) deveria provocar, num prazo muito curto, uma infecção máxima.

Assim por exemplo DOERR (2, 1938, p. 36) comentando a teoria, então nova, da transformação autocatalítica da proteina da planta inoculada, em núcleo-proteina com as qualidades de virus, se manifesta de maneira seguinte:

"Se supomos que já poucas moléculas da proteina de virus têm a capacidade de provocar a transformação criadora de virus no metabolismo protéico em plantas diferentes, não se compreende a existência de diferenças quantitativas". De acôrdo com o que entendemos do citado trecho do trabalho de DOERR, o sentido literal da nova teoria

seria que qualquer planta suscetivel ao virus, uma vez eficientemente inoculada, deveria acabar produzindo a mesma quantidade de virus.

Na realidade, porém, muitas referências da literatura, como por exemplo as de KAUSCHE (4, 1937) e de MCKINNEY e CLAYTON (7, 1944) e certas observações nossas indicam que a concentração do inóculo tem de fato, importância, tanto para o resultado final da multiplicação do virus nas plantas, como para o caráter dos sintomas exibidos. Por essa razão é que resolvemos novamente tentar estudar experimentalmente a maneira pela qual a concentração do inóculo influe no processo do aumento da atividade do virus na planta.

Quizemos, com os nossos ensaios, contribuir ainda para a elucidação de alguns detalhes dêsse mecanismo da multiplicação do virus nas plantas, como por exemplo os problemas relativos à intensidade, continuidade e velocidade do processo. Com êsse fim iniciamos os estudos, seguindo a técnica desenvolvida por RISCHKOV (9, 1943) e acompanhando, por meio de ensaios executados em intervalos de 2 até 4 dias, o processo do aumento da atividade do virus em fôlhas destacadas durante os primeiros 20 dias após a inoculação.

Estivemos particularmente interessados em saber, por êsses ensaios, quando o índice da atividade do virus na fôlha inoculada atinge o seu máximo, e se a multiplicação se efetua de maneira contínua ou periódica.

Servimo-nos ainda das mesmas experiências para estudar a influência de outros fatores na multiplicação do virus. Assim, de um lado fizemos algumas observações relativas à influência da temperatura ambiente, da nutrição e da idade das fôlhas, na intensidade do aumento do poder infetivo do virus. Por outro lado, estudamos também o aumento da atividade do virus em fôlhas de plantas pertencentes a variedades conhecidas por possuirem diferentes graus de resistência ao virus do mosáico comum do fumo. Como variedade suscetivel usamos principalmente uma amostra de fumo "*White Burley*", descendente de sementes recebidas em 18-6-1938 graças à valiosa assistência prestada pelo Prof. JAMES JOHNSON, de Madison, U.S.A. Como variedade resistente empregamos nestes ensaios uma amostra de fumo "*Palmira 12*", cedida gentilmente para fins de experimentação pelo Dr. CIRO MOLINA GARCÊS, Secretário da Agricultura do Departamento do Vale de Cauca, Cali, Colômbia, e outra chamada "*Buga*", também de origem colombiana.

Na parte dêste trabalho dedicada à apresentação dos dados experimentais, exporemos a influência de cada um dêsses fatores na multiplicação da atividade do virus.

MATERIAL E MÉTODOS

1) Ensaios executados com fôlhas destacadas.

A grande vantagem que o emprêgo de fôlhas destacadas oferece para estudos acêrca da multiplicação de virus foi recentemente posta em destaque por RISCHKOV (9, 1943). Seguimos, pois, na maioria dos ensaios aqui apresentados, a técnica por êle recomendada.

As plantas que forneceram as fôlhas para êstes ensaios foram sempre cultivadas na estufa, à prova de insetos, e tinham cêrca de 2 meses de idade.

As fôlhas, em geral de uma posição média na planta, e de um comprimento de cêrca de 12 cm, foram destacadas da planta-mãe na tarde do dia anterior à inoculação, por meio de corte executado no pecíolo mergulhado em água. Depois dessa operação cada fôlha foi colocada com a base do pecíolo em uma pequena caixa de Petri contendo, de acôrdo com o objetivo da experiência, água ou solução nutritiva, enquanto que o limbo pousava num suporte de cartão, montado em uma placa de vidro (vide Estampa 9, fig. *A*).

A primeira série de ensaios foi executada no próprio laboratório e com luz difusa, ao passo que nas séries subseqüentes as fôlhas foram colocadas num compartimento especial de uma estufa de vidro, bem iluminada (vide Estampa 9, fig. *B*). As oscilações da temperatura e da umidade nesse compartimento foram acompanhadas por meio de um termógrafo e de um higrómetro.

As inoculações foram feitas na manhã do dia seguinte ao do corte das fôlhas, friccionando-se a superfície do limbro com suco obtido pela trituração de fôlhas de plantas de fumo que tinham sido inoculadas, cêrca de um mês antes, com uma amostra purificada de mosáico comum do fumo. Preparamos diluições de 1/10 e 1/10.000 dêste suco por meio de adição de água distilada. Cada fôlha foi inoculada numa metade com a diluição 1/10 e noutra, separada da primeira pela nervura principal, com a diluição 1/10.000. Imediatamente após a inoculação, lavamos as fôlhas abundantemente com água corrente. Nos últimos ensaios isso foi feito sem se tirar a base do pecíolo do líquido em que estava mergulhada.

Após a inoculação das fôlhas quizemos averiguar se restos do inóculo ficavam aderidos à superfície das fôlhas, dando margem a suposições erradas sôbre um teôr inicial de virus nas fôlhas.

Para esclarecer esta questão retiramos, pelo menos nas últimas 3 séries, logo após a lavagem das fôlhas, um pequeno lote delas para preparar sucos e examinar a sua eventual atividade patogênica. Êstes

como todos os outros ensaios de inoculação, que se seguiram com intervalos determinados, foram efetuados da seguinte maneira:

Eliminamos, por corte com tesoura esterilizada, as nervuras principais de algumas fôlhas, separando assim as duas metades do limbo. Reunimos então em um grupo tôdas as metades que tinham sido friccionadas com o inóculo mais concentrado, ao passo que formamos um segundo grupo com as metades das fôlhas que tinham sido inoculadas antes com o virus mais diluido.

Preparamos, isoladamente, sucos de cada um dêsses dois grupos de metades de fôlhas e testamos geralmente o poder infeccioso dêsses sucos, não só em concentração normal, mas ainda na diluição 1/10.

Para tal teste, que consistia na comparação do poder infeccioso de 4 sucos, usamos sempre um grupo de cinco plantas de *Nicotiana glutinosa,* cada uma das quais provida de cinco fôlhas. Uma fôlha de cada planta ficou sem tratamento, servindo de testemunha. Sôbre as quatro fôlhas restantes das cinco plantas do nosso grupo distribuimos os 4 sucos a serem comparados, de maneira a permitir a verificação do efeito de cada suco sôbre cinco fôlhas de posição diferente no caule. Na organização dos ensaios seguimos o esboço indicado e elaborado por YOUDEN e BEALE (18, 1934).

Após o aparecimento de sintomas locais, bastante nítidos, nas fôlhas inoculadas de *Nicotiana glutinosa,* efetuamos contagens exatas do número dessas necroses. Somamos os valores correspondentes aos números provocados pelo mesmo suco e calculamos finalmente a média dessa soma. Êste algarismo representa, pois, o número de necroses provocado por um determinado suco, numa média de 5 fôlhas de *Nicotiana glutinosa.* Executando tais ensaios relativos ao poder infeccioso dos sucos, em intervalos sucessivos, com os diversos lotes de fôlhas, que ao mesmo tempo tinham sido inoculadas com o virus, procuramos acompanhar o ritmo da multiplicação do virus nas fôlhas friccionadas. Nos gráficos que traçamos para ilustrar o progresso da multiplicação do virus em fôlhas destacadas, as ordenadas das curvas representam as médias do número de necroses produzidas por cada suco, ao passo que as abscissas correspondem ao número de dias decorridos entre a inoculação das fôlhas e a trituração delas para o teste da atividade infecciosa.

2) Ensaios executados com plantas inteiras.

Era também de nosso grande interêsse verificar se diferem entre si os sintomas provocados em plantas de fumo por diversas diluições do mosáico comum. Por isso resolvemos completar os nossos

ensaios realizados com fôlhas destacadas das plantas-mães, executando algumas séries de experiências em que foram utilizadas plantas inteiras. Nestes últimos experimentos dividimos as plantas sadias, que faziam parte de cada série, em grupos, inoculando em seguida cada grupo com uma diluição diferente do mosáico do fumo. Acompanhamos depois, durante algumas semanas, o desenvolvimento dos sintomas.

Estas diversas séries de experiências tiveram início respectivamente em 18-11, 2-12 e 29-12-1943 e em 8-3 e 25-4-1944.

Todos êstes ensaios foram executados com plantas cultivadas em vasos e colocados na estufa à prova de insetos.

APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

I) Ensáios executados com fôlhas destacadas.

1) Série de ensaios iniciada em 12-2-1944.

Esta série abrange ensaios executados apenas em 20 fôlhas. Nestas fôlhas, que eram de tamanho médio e pertenciam à variedade de fumo *White Burley*, estudou-se o aumento do virus durante um período de 6 dias. Dividiu-se o total das fôlhas, que compunham esta série, em 3 lotes, dos quais se prepararam sucos respectivamente no 4.º, 5.º e 6.º dia após a inoculação.

Deve-se mencionar ainda que as fôlhas que nesta série foram conservadas dentro do próprio laboratório, perderam rapidamente a turgescência e tenderam a amarelecer. Êste comportamento deve-se provàvelmente às condições desfavoráveis de iluminação a que as fôlhas estiveram expostas.

Para possibilitar o aproveitamento das fôlhas que já haviam começado a murchar, deixamo-las flutuar — repetidamente durante várias horas — sôbre a superfície da água.

Os resultados dos ensaios de inoculação executados em fôlhas de *Nicotiana glutinosa* acham-se representados no gráfico 1.

No intuito de contribuir para melhor entendimento dos nossos gráficos vamos dar em seguida a explicação de alguns sinais que introduzimos na legenda dêles.

Chamaremos, daqui por diante, de A e B as duas metades do limbo, inoculadas respectivamente com a concentração forte e fraca do virus, e de *a* e *b* os sucos provenientes dessas metades. Estudamos então, nesta série, em 3 datas sucessivas de observação, a atividade de virus dos sucos *a*, *b* e 1/10 *a* e 1/10 *b*.

Referindo-nos primeiro ao aumento da atividade do virus nas fôlhas em relação ao tempo decorrido a partir da inoculação, pode-se

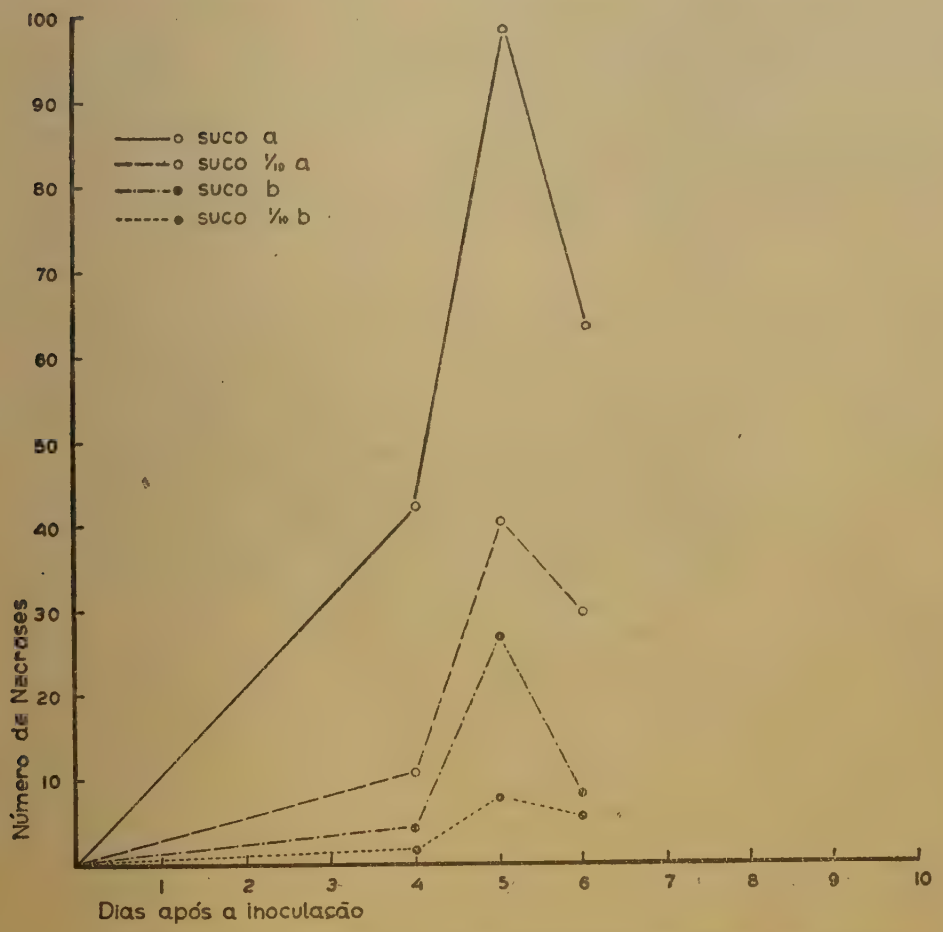


Fig. 1 — Representação gráfica dos resultados da inoculação em fôlhas de *Nicotiana glutinosa* da 1.ª série de ensáios iniciada em 12/2/944.

concluir das nossas observações que o maior número de necroses foi provocado pelos sucos preparados, 5 dias após a inoculação. Dentro do prazo da nossa experimentação, os 4 sucos alcançaram, então, o máximo da atividade no 5.º dia após o tratamento das fôlhas com o inóculo. No 6.º dia, as fôlhas restantes desta série já forneceram sucos menos infecciosos. E' necessário, porém, levar em consideração que nos últimos dias as fôlhas já não se achavam em satisfatórias condições de conservação e que não era possível estender as observações por um lapso de tempo mais longo.

Resta-nos ainda explicar quais as diferenças manifestadas com relação ao aumento do título do virus entre as metades A e B do limbo. Pode-se dizer, com segurança, que a atividade do virus na metade das fôlhas inoculada com a diluição 1/10.000 (B), não alcançou de nenhum modo, durante os 7 dias de observação, o valor verificado na

outra metade (A). Esta superioridade da atividade de virus da metade do limbo originalmente inoculada com o suco mais concentrado manifestou-se nas inoculações em *Nicotiana glutinosa*, tanto nas executadas com o suco normal como nas relativas ao suco diluido.

2) Série de ensaios iniciada em 1-3-1944.

Também esta série de ensaios foi executada com 20 fôlhas de fumo da variedade *White Burley*. Apesar de permanecerem as fôlhas, nesta série, num compartimento da estufa e não no laboratório, o estado de conservação deixou muito a desejar. Mesmo assim conseguimos manter viva uma parte das fôlhas até o 13.º dia após a inoculação. Nesta série foram feitas determinações da atividade infecciosa dos sucos (por inoculações em fôlhas de *Nicotiana glutinosa*) no dia da inoculação das fôlhas de fumo e após a conservação delas durante 4, 10 e 13 dias, respectivamente.

Os resultados dêstes ensaios estão representados no gráfico n.º 2.

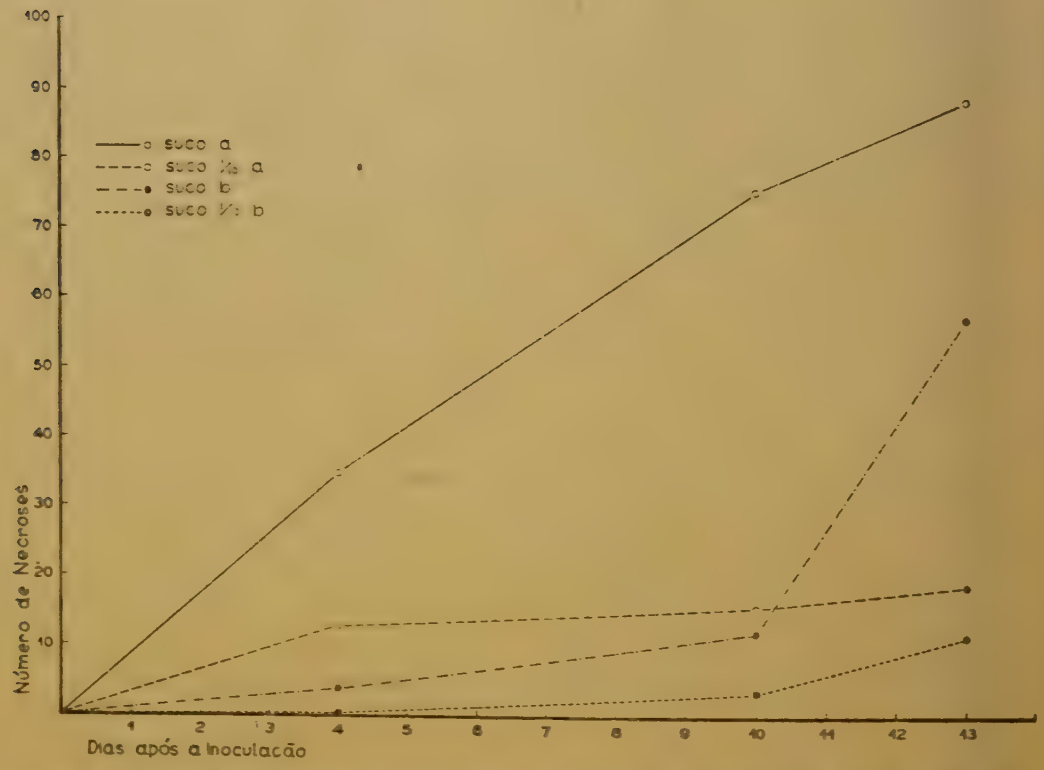


Fig. 2 — Representação gráfica dos resultados da inoculação em fôlhas de *Nicotiana glutinosa* da 2.ª série de ensaios, iniciada em 1/3/944.

Submetendo as indicações reveladas pelo gráfico 2 a uma apreciação que obedece à mesma ordem observada na exposição do gráfico 1,

devemos estudar, em primeiro lugar, nesta nova série de ensaios, a relação entre a multiplicação do virus e o tempo transcorrido desde a data da inoculação. E' possível considerar aqui, como ponto de partida, o poder infeccioso verificado no próprio dia da inoculação. As experiências efetuadas com os sucos obtidos das fôlhas de fumo recem-inoculadas (após uma lavagem cuidadosa) deram resultados totalmente negativos. Dêsse resultado podemos concluir que as fôlhas nesse dia não continham uma quantidade suficiente de virus para provocar necroses em *Nicotiana glutinosa.*

Quanto ao aumento da atividade do virus nos dias subsequentes, podemos depreender do nosso gráfico que o maior número de necroses em fôlhas de *Nicotiana glutinosa* foi provocado pelos sucos, ensaiados no 13.º dia após a inoculação das fôlhas.

Isso quer dizer que o poder infeccioso do virus nas fôlhas inoculadas aumentou até o último dia da experimentação. E' necessário, porém, levar em consideração que êste resultado só é valido com certas restrições. Primeiro, deve-se admitir que a atividade dos sucos desta série foi geralmente bastante fraca. Depois é mister frizar que não dispomos de indicações muito exatas a respeito da continuidade dêste aumento, porque não examinamos a atividade dos sucos entre o 4.º e o 10.º dia.

Queremos nos referir em seguida às diferenças do título do virus entre os sucos preparados das duas metades do limbo.

Comparando assim o poder infeccioso dos sucos *a* e *b* nas datas sucessivas de experimentação, podemos dizer que a diferença na capacidade dêles de produzir necroses nas fôlhas de *Nicotiana glutinosa*, foi de início bastante acentuada, mas tendeu a diminuir na última data de observação. Isso corrobora a suposição de que nos primeiros dias após a inoculação das fôlhas processar-se-ia um aumento mais notável da atividade do virus na metade do limbo infeccionada com a maior concentração inicial do inóculo. Mais tarde, porém, o aumento nesta metade tornar-se-ia relativamente mais lento, ao passo que se intensificaria a multiplicação do virus na metade do limbo que tinha recebido a inoculação com uma concentração inicial mais fraca.

Devemos mencionar, porém, que nem no 13.º dia após a inoculação das fôlhas os sucos *b* chegaram a provocar, nas fôlhas de *Nicotiana glutinosa*, o mesmo número de necroses do que os sucos *a*.

Até agora temo-nos referido exclusivamente à capacidade patogênica dos sucos normais. As curvas correspondentes ao poder infeccioso dos sucos diluidos 1/10, embora possuindo ordenadas de menor

valor, acompanharam até certo ponto as flutuações das curvas relativas à atividade infecciosa dos sucos normais.

3) Série de ensaios iniciada em 16-3-1944.

Nesta série, que também era constituida de 20 fôlhas de fumo da variedade *White Burley,* introduzimos algumas inovações na técnica. Primeiro merece ser mencionado que a base do pecíolo das fôlhas nesta série não foi posta em água de torneira, mas sim em solução nutritiva segundo KNOP. Esta solução contém, por litro água 0,25 gr de $MgSO_4$, 1 gr de $Ca(NO_3)_2$, 0,25 gr de KH_2PO_4, 0,12 gr de KCl e traços de $FeCl_2$. Esta solução foi renovada cada 2 dias nas pequenas placas de Petri que serviram como recipientes de líquido para as fôlhas estudadas. Tratadas desta maneira, as fôlhas se conservaram muito melhor do que nas séries anteriores. Êste bom estado da conservação das fôlhas tornou possível estender a experimentação a um período de 18 dias. Ensaios de inoculação em fôlhas de *Nicotiana glutinosa* foram realizados com sucos preparados de fôlhas do fumo respectivamente no 1.°, 4.°, 11.°, 15.° e 18.° dia após o friccionamento das fôlhas com virus.

Pela primeira vez acompanhamos também nesta série as variações da temperatura, que se verificaram durante a época da experimentação, por meio de um termógrafo. Anotamos, além disso, diariamente, por meio de um higrómetro, o grau de humidade relativa do ar. Os resultados dos ensaios de inoculação, executados, de maneira usual, em fôlhas de *Nicotiana glutinosa,* estão representados no gráfico 3.

Em primeiro lugar devemos mencionar que também neste caso os sucos obtidos de fôlhas recentemente inoculadas, 1 dia após o tratamento com virus, não produziram necroses nas fôlhas de *Nicotiana glutinosa.* Êste resultado tem para nós grande interêsse por fornecer a base experimental para a nossa suposição de que a atividade de virus, verificada nas datas posteriores de observação se deve, realmente, a um aumento do virus dentro da célula viva.

As alterações sucessivas da atividade do virus podem ser avaliadas por meio da comparação dos resultados dos ensaios de inoculação executados no 4.°, 11.°, 14.°, 15.°, 16.° e 18.° dia. Referindo-nos, em primeiro lugar, ao suco *a,* observamos um rápido aumento do seu poder infeccioso dentro dos primeiros 10 dias após a inoculação. Depois de uma abrupta queda da atividade do virus, ocorrida no 14.° dia, manifesta-se, nos 4 últimos dias de observação, um aumento contínuo do poder infeccioso dêste suco, que resulta num máximo muito pro-

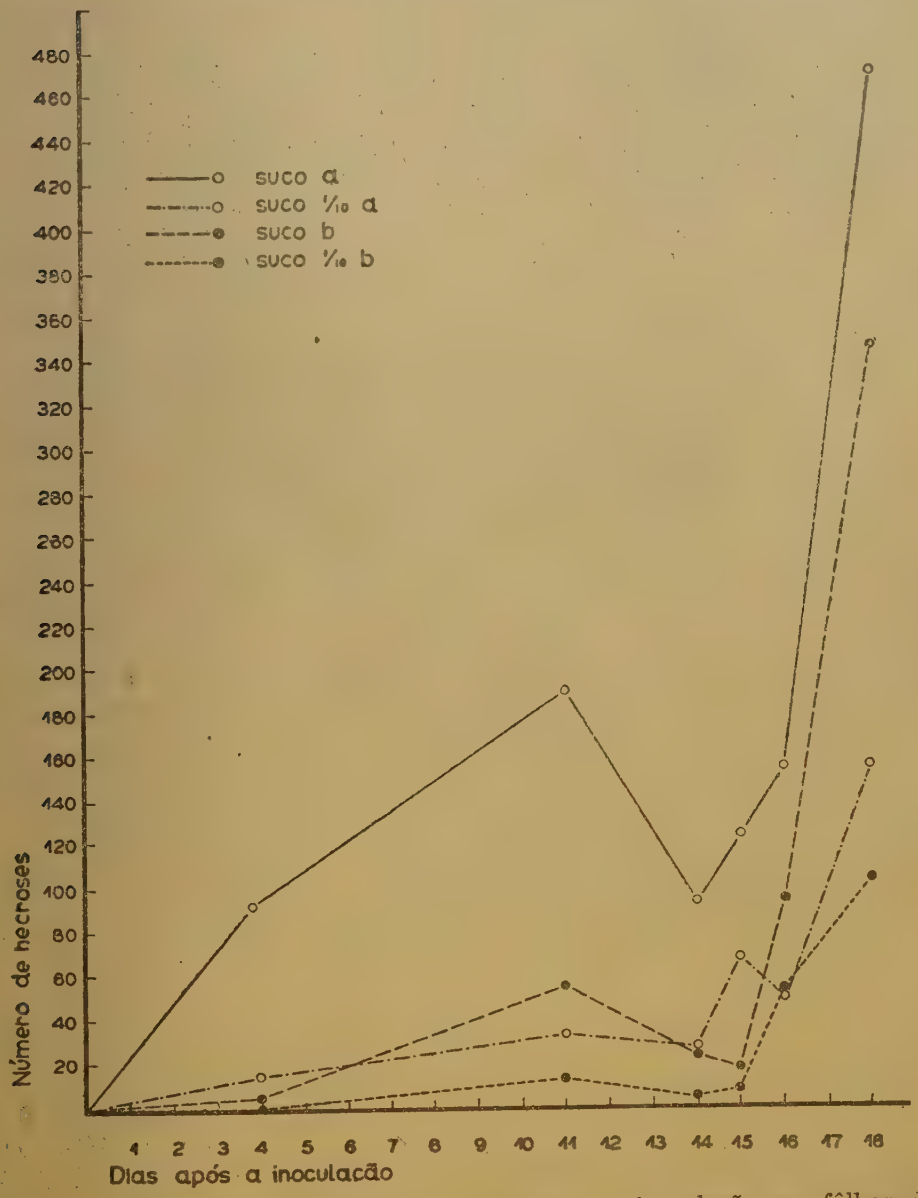


Fig. 3 — Representação gráfica dos resultados da inoculação em fôlhas de *Nicotiana glutinosa* da 3.ª série de ensaios, iniciada em 16/3/944. Nesta série as bases das fôlhas foram mergulhadas em solução nutritiva.

nunciado, verificado no 18.º dia. O suco inoculado naquele dia em fôlhas de *Nicotiana glutinosa* provocou nelas uma média de 472 necroses, número jamais alcançado nos nossos ensaios de inoculação em fôlhas de *Nicotiana glutinosa*.

Comparando com êste aumento da atividade do virus verificado na metade A das fôlhas a intensificação do poder infeccioso na metade oposta (B) do limbo das fôlhas, nota-se uma grande analogia entre

os gráficos representativos das variações diárias da atividade do virus nas duas metades do limbo. Isso pode ser exemplificado pelo fato de apresentarem também os sucos *b* assim como os sucos *a* um aumento de atividade nas primeiras datas sucessivas de observação até o 11.º dia, aumento seguido, no caso dos sucos *b*, de uma queda mais prolongada (até o 15.º dia). Depois manifesta-se um aumento muito rápido da atividade do virus, que atinge no 18.º dia um máximo cujo valor absoluto não é muito inferior ao verificado no mesmo dia para o suco *a*, sem todavia, alcançá-lo.

As variações da atividade patogênica dos sucos nos dias sucessivos de observação verificam-se, geralmente, de maneira análoga, tanto nas inoculações feitas com sucos normais, como nas efetuadas com sucos diluidos com água (1/10).

Apenas no período compreendido entre o 14.º e o 16.º dia de observação notamos ligeiras discrepâncias entre o comportamento dos sucos concentrados e diluidos, discrepâncias que por ora não sabemos explicar.

Em comparação com as séries anteriores de ensaios, realizadas em 12-2-1943 e em 1-3-1944, a nossa nova série permitiu acompanhar as flutuações da atividade do virus durante um prazo muito mais extenso; podemos assim inferir, dos dados desta nova série, que o aumento da atividade do virus em fôlhas destacadas continua pelo menos durante 18 dias. As observações das séries anteriores tinham abrangido um menor período e podiam ter conduzido por isso à uma conclusão errônea com relação à duração da fase do aumento da atividade do virus.

Finalmente devemos ainda abordar a questão de uma eventual relação existente entre a atividade do virus nos vários dias de observação e a temperatura do compartimento em que se achavam guardadas as fôlhas. Durante os primeiros 15 dias de observação, a temperatura se manteve relativamente constante (cêrca de 28°C), tendo sofrido, porém, no fim dêste período, uma queda forte, de 11 graus. Esta queda da temperatura coincidiu com o maior aumento da atividade do virus das fôlhas. De acôrdo com as referências de RISCHKOV (9, 1943) a respeito da influência que a temperatura exerce no aumento da atividade do virus, dever-se-ia esperar que a temperatura mais alta tivesse favorecido a elevação do poder infeccioso do virus. Acreditamos, por isso, que o forte aumento da atividade do virus das fôlhas, verificado a partir do 15.º dia, não pode ser considerado como direta conseqüência da queda da temperatura, ocorrida neste dia. Não se pode tão pouco estabelecer uma relação entre as variações do poder

infeccioso das fôlhas e a umidade relativa do ar, considerando que o grau de umidade se manteve num nível praticamente constante durante o período da experimentação.

Achamos os resultados conseguidos nesta série, especialmente na parte relativa a um máximo da atividade de virus alcançado após um lapso de tempo relativamente considerável, tão interessantes e inesperados, que procuramos confirma-los por novas séries de observações.

Comunicamos, a seguir, os resultados obtidos nos ensaios da 4.ª série de experimentos.

4) Série de ensaios iniciada em 18-4-1944.

Esta série foi efetuada com um número consideravelmente maior de fôlhas. Visamos estudar aqui o comportamento relativo ao aumento da atividade do virus, de fôlhas pertencentes tanto a variedades suscetíveis, como resistentes ao mosáico comum do fumo. Empregamos, por isso, nestas experiências fôlhas de duas variedades de fumo, isto é, da variedade *"Palmira 12"*, (resistente) proveniente da Colômbia, e de uma variedade de fumo do tipo *Burley* (suscetível). De cada uma dessas duas variedades inoculamos 36 fôlhas, de tamanho médio bastante uniforme.

A metade dêsse número de fôlhas de cada variedade foi montada — da maneira antes descrita — em caixas de Petri, contendo a solução nutritiva de KNOP. A outra metade, tratada, aliás, de maneira igual, foi posta em caixas de Petri correspondentes, contendo água de torneira. Em tôdas as caixas renovamos o líquido em períodos de 3 dias.

Assim como nas séries antecedentes, uma metade do limbo (A) de cada fôlha foi inoculada com uma diluição 1/10 do suco contendo virus, ao passo que a outra parte do limbo (B) foi friccionada com a diluição 1/10.000 do mesmo suco.

Comparamos, nesta série, o título do virus alcançado em diversas datas de observação nas metades opostas do limbo das fôlhas de duas variedades de fumo, submetidas a dois diversos processos de alimentação.

Devido a esta maior complexidade da nossa experimentação, tivemos que averiguar, em cada data de observação, a atividade do virus de 8 sucos diversos. Limitamo-nos, por isso, nesta série, à execução de inoculações de sucos normais *a* e *b* em fôlhas de *Nicotiana glutinosa*, sem realizar, como nas séries anteriores, também inoculações com os sucos diluidos com água (*a* 1/10 e *b* 1/10).

O estado de conservação das fôlhas foi, nesta série, bem satisfatório. Geralmente as fôlhas da variedade *Burley* se conservaram melhor do que as da variedade *Palmira 12*. As fôlhas das duas variedades, quando conservadas em água, amareleceram antes das mantidas em meio nutritivo. Em todo caso, pudemos executar, com as fôlhas dos 4 grupos, ensaios de inoculação em fôlhas de *Nicotiana glutinosa* no próprio dia do friccionamento com o suco e após um lapso de tempo de 2, 4, 6, 8, 10, 14, 16, 18 e 20 dias. Duas fôlhas restantes da variedade *Palmira 12* conservaram-se tão bem no líquido nutritivo que foi possível, neste grupo, efetuar ainda um ensaio de inoculação em fôlhas de *Nicotiana glutinosa* após 23 dias. Como na série anterior, acompanhamos, durante todo o período da experimentação, as variações de temperatura e umidade do ar.

Os gráficos 4 e 5 representam o aumento do nosso índice da atividade do virus das fôlhas pertencentes respectivamente às variedades *"Palmira 12"* e *"Burley"*, mostrando ainda as diferenças existentes entre os grupos de fôlhas colocadas em água e em meio nutritivo.

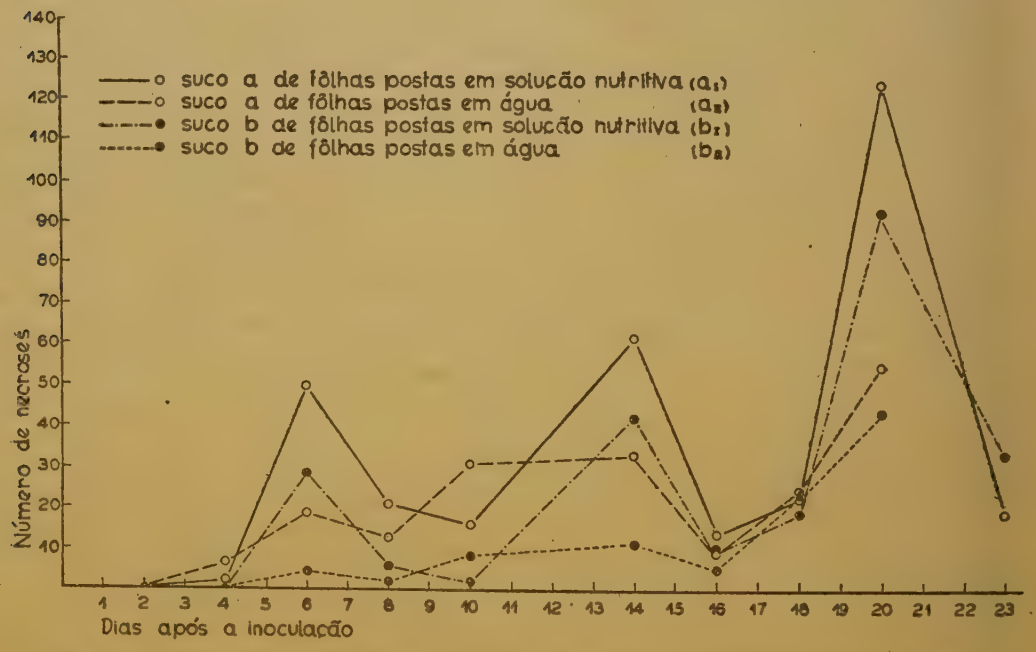


Fig. 4 — Representação gráfica dos resultados da 4.ª série (*a*) de ensaios, inicida em 18/4/1944 e executada com o suco de fôlhas da variedade *"Palmira 12"* de fumo. A metade das fôlhas (I) alimentada em solução nutritiva, a outra metade (II) mantida em água.

Analisando êstes gráficos veremos em primeiro lugar quais as conclusões gerais a respeito da maneira do aumento da atividade do

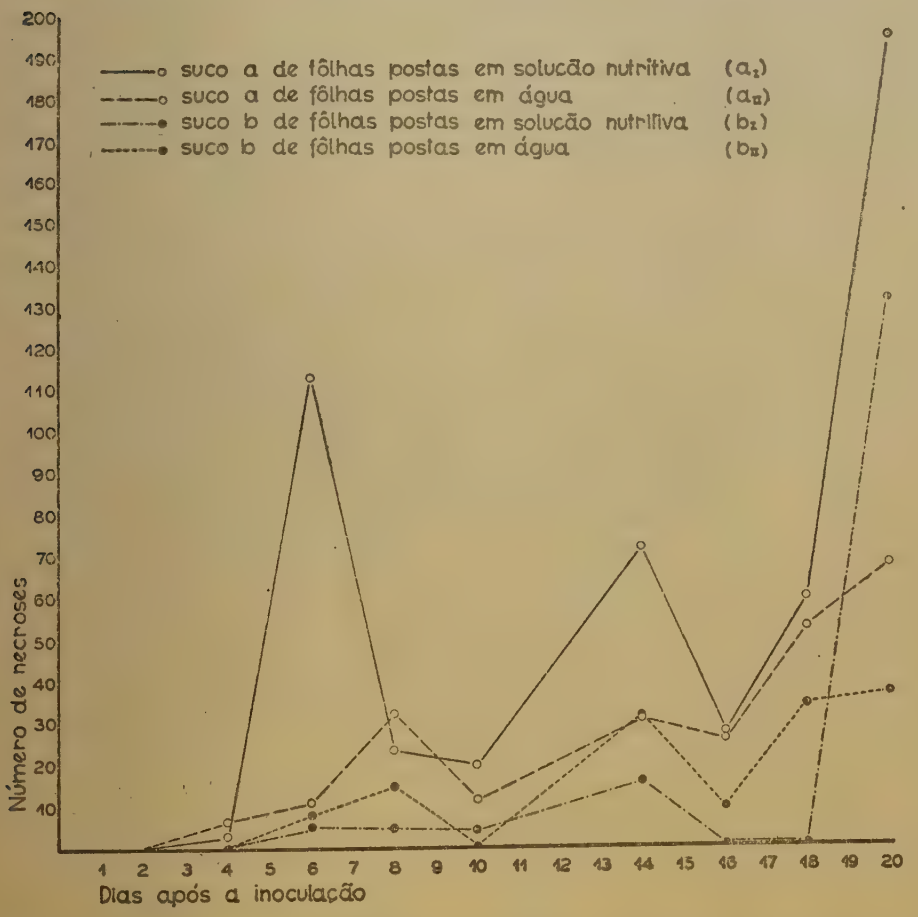


Fig. 5 — Representação gráfica dos resultados da 4.ª série (*b*) de ensaios, iniciada em 18/4/944 e executada com sucos de fôlhas de uma variedade de fumo do grupo *"Burley"*. A metade das fôlhas (I) alimentada em solução nutritiva, a outra metade (II) mantida em água.

virus, em função do tempo decorrido a partir da inoculação. Depois tentaremos esclarecer qual a influência que o sistema de alimentação das fôlhas pode exercer nas flutuações do poder infeccioso do virus. Em seguida exporemos as diferenças no aumento da atividade do virus encontradas entre as duas variedades do fumo. Finalmente abordaremos ainda a questão da relação existente entre o ritmo do aumento da atividade do virus nas fôlhas e a concentração original do inóculo.

Iniciando, então, a interpretação dos gráficos, devemos logo destacar o fenômeno que mais chama a atenção e que consiste na alternação, de períodos de alta e baixa atividade do virus em todos os grupos.

Tomando como exemplo o gráfico que representa o aumento do título do virus nas fôlhas de fumo *Palmira,* conservadas em solução

nutritiva, nota-se na parte correspondente à metade A do limbo no 6.º, 14.º e 20.º dia após a inoculação, a ocorrência de períodos de alta atividade de virus, que contrastam nitidamente com os de atividade baixa, observados no 10.º, 16.º e 23.º dias de observação. Merece ainda ser mencionado o fato de que os valores absolutos dos 3 máximos consecutivos formam uma série ascendente. Por outro lado, não há diferença apreciável entre os valores absolutos dos mínimos.

E' verdade que não se pode negar a possibilidade de provirem certas peculiaridades, justamente desta curva, de qualquer desigualdade entre as nossas plantas experimentais de teste. Por outro lado, também as curvas relativas à atividade dos outros sucos examinados, embora diferindo em muitos pontos, concordam pelo menos no fato de apresentarem alternativamente altos e baixos correspondentes a variações periódicas da atividade do virus.

Acreditamos poder tirar dêste caráter concordante dos nossos gráficos a conclusão de que a acumulação do virus não se efetua contìnuamente durante 20 dias, mas sim que haja uma alternação de vários períodos de baixa e de alta atividade, atingindo estas últimas pontos de culminância cada vez mais elevados.

Não podemos dizer, se, no caso de maior duração do período de observação, o virus poderia atingir ainda maiores valores de atividade. Consideramos, porém, esta questão de importância secundária. Quernos parecer que se deve atribuir muito mais valor ao fato de que todos os sucos por nós examinados manifestaram o máximo da sua eficiência 20 dias após a data da inoculação, isto é, após um lapso de tempo bastante dilatado.

Procurando agora focalizar as diferenças relacionadas com a maneira da alimentação das fôlhas, podemos dizer que o aumento da atividade do virus nos primeiros 4 dias depois da inoculação efetuou-se com maior intensidade nas fôlhas conservadas em água. Dêste dia em diante, porém, as fôlhas alimentadas com solução nutritiva atingiram um índice de atividade que superou consideravelmente o valor correspondente ao das fôlhas mantidas em água. E' verdade que nos períodos de baixa atividade do virus as fôlhas, cujo pecíolo mergulhava em água, voltaram a apresentar, em alguns casos, maiores valores de atividade do que as que receberam alimentação suplementar. Mas sempre nos períodos de intensa atividade de virus que se seguiram a êstes intervalos de intensidade reduzida, as fôlhas que recebiam a solução nutritiva alcançavam valores consideravelmente mais altos do que as fôlhas de comparação.

Como já expuzemos antes, pretendiamos estudar nesta série também o comportamento comparativo de diversas variedades do fumo com relação ao aumento do título do virus. Resta-nos, então, expôr as principais diferenças entre os nossos gráficos 4 e 5, que representam o aumento do poder infeccioso do virus nas fôlhas das variedades *Palmira 12* e *Burley*.

Nosso primeiro intúito foi comparar o comportamento das fôlhas da variedade *Palmira 12* com o de fôlhas correspondentes da variedade *White Burely*, que é comprovadamente suscetível ao mosáico comum do fumo. Na época, porém, em que as plantas da variedade *Palmira 12* atingiram um estado de desenvolvimento apropriado para a experimentação, faltaram-nos mudas bastante crescidas da variedade *White Burley*, de maneira que tivemos que recorrer a plantas de uma variedade do grupo *Burley*, igualmente suscetível ao mosáico, mas de origem desconhecida.

Como primeiro resultado desta comparação deve-se destacar que na seqüência geral das fases alternativas do aumento da atividade de virus não foram verificadas grandes diferenças entre as fôlhas das variedades de fumo suscetível e resistente. Nos dias em que os sucos prensados de fôlhas da variedade *Palmira 12* provocaram grande número de necroses em *Nicotiana glutinosa*, geralmente também os sucos fornecidos pelas fôlhas da variedade *Burley* mostraram uma atividade elevada. Por outro lado coincidiram geralmente nas duas variedades também os períodos de atividade reduzida. A êste resultado deve-se atribuir interêsse especial, se se considerar que os sucos provenientes da variedade *Palmira 12* foram sempre testados num grupo de plantas de *Nicotiana glutinosa* diferente do empregado para a variedade *Burley*. Por isso tanto mais somos forçados a admitir que os períodos alternativos de alta e baixa atividade de virus relacionam-se, de fato, com o tempo decorrido desde a inoculação das fôlhas e com o mecanismo do aumento da atividade do virus nas fôlhas. Assim acreditamos poder concluir dêste resultado, que o processo da acumulação do virus se efetua, de fato, mesmo em fôlhas de diversas variedades de fumo, sob a forma de surtos periódicos.

Referindo-nos agora à comparação da intensidade do aumento do virus nas duas variedades de fumo, pode-se dizer, todavia, que os sucos prensados das fôlhas da variedade *Burley* distinguiram-se geralmente por uma atividade do virus maior do que os das fôlhas da variedade *Palmira 12*.

Passaremos finalmente à explicação dos resultados desta série, que se referem às diferenças entre as metades A e B do limbo, quanto

ao aumento da atividade do virus. Como nas nossas três séries de ensaios já descritas, também aqui os sucos prensados da metade A do limbo mostraram nos primeiros dias subseqüentes à inoculação maior atividade do que os obtidos da metade B. Nos últimos dias de observação, porém, os sucos *b* tendiam a igualar os sucos *a*. Geralmente, pelo menos durante o prazo da nossa experimentação, a atividade do virus, na parte das fôlhas que fôra friccionada com a concentração mais fraca do inóculo, não alcançou o valor correspondente da atividade atingida na outra metade das fôlhas. Em um único caso, porém, isto é, nas fôlhas da variedade *Palmira 12*, cujos pecíolos tinham sido postos em solução nutritiva, verificamos, na observação feita 23 dias após o friccionamento das fôlhas com o inóculo, uma superioridade no poder infeccioso das metades B das fôlhas sôbre as metades A.

Achamos interessante que esta inversão da relação existente entre a concentração do inóculo e a atividade do virus fôsse justamente encontrada nas fôlhas de uma variedade de virus considerada resistente ao mosáico comum. Êste resultado pode ser explicado se admitirmos que nas células de variedades resistentes ocorrem processos metabólicos, contrários a um aumento excessivo da virus-proteina. Assim entender-se-ia que mesmo na metade de limbo inoculada com doses massiças do agente causador, o virus não chegaria a alcançar um grau de atividade muito elevado. Reportar-nos-emos outra vez à esta hipótese acêrca do comportamento especial com relação ao aumento do título de virus de variedades de fumo resistentes ao mosáico, na parte dêste trabalho dedicada à discussão. Continuando ainda a examinar as nossas curvas, podemos notar que nos ensaios relativos à variedade *Burley*, o índice do teor de virus das metades do limbo que tinham sido friccionadas com o inóculo mais concentrado, excedia de fato sempre o valor correspondente às outras metades, mesmo nas últimas datas de observações.

Também outro resultado dêste grupo de experiências deve ser ainda realçado. Queremos nos referir à grande semelhança das flutuações periódicas da atividade de virus, verificadas nos dias sucessivos de observação para os sucos *a* e *b*. Apesar dos sucos provenientes da metade do limbo denominada B apresentarem geralmente valores mais baixos de atividade patogênica do que os sucos correspondentes à metade A, ambos alcançaram, quase sempre no mesmo dia, o relativo máximo e mínimo da atividade. Esta concordância relativa entre os sucos *a* e *b* na sua capacidade de produzir necroses nas fôlhas de *Nicotiana glutinosa* torna-se especialmente evidente, se examinar-

mos o gráfico que representa o aumento do poder infeccioso de virus nas fôlhas de *Palmira 12*. (Fig. 4)

Já se comportam de maneira um pouco diferente as fôlhas da variedade de fumo *Burley*, principalmente as do grupo alimentado com solução nutritiva. Isso foi verificado pelo menos nos primeiros 14 dias de observação. A atividade do virus na metade destas fôlhas tratada com o inóculo mais concentrado, alcançou no 6.º e no 14.º dia valores muito altos, ao passo que a outra metade do limbo das fôlhas manteve durante todo êsse tempo um nível relativamente baixo e constante. Em todo caso e apesar desta exceção, é muito impressionante a grande semelhança entre as curvas representativas do aumento da atividade do virus nos diversos grupos de fôlhas, semelhança que apoia a idéia já mencionada de um aumento da patogenicidade do virus sob a forma de surtos periódicos, de intensidade sucessivamente crescente, e interrompidos por intervalos de atividade reduzida.

As flutuações da temperatura e da umidade relativa não sofreram, no decorrer desta série de ensaios, alterações súbitas que nos levassem a admitir a existência de qualquer relação entre a maior ou menor atividade do virus nas fôlhas e o grau de intensidade dêsses fatores externos.

Comparando finalmente os gráficos ilustrativos dos resultados desta última série de ensaios com os que representam as observações das experiências anteriores (1, 2, e 3), percebe-se nitidamente que, nesta última série, os sucos não alcançaram valores de atividade muito elevados.

Esta diferença do valor real do máximo de atividade, entre a última série e as séries antecedentes, pode ser atribuida a vários fatores. Devemos, por exemplo, mencionar aqui que a 3.ª série de ensaios foi efetuada numa temperatura média de 28°C, ao passo que durante a 4.ª série a temperatura se manteve numa média de 21°C. Poder-se-ia, então, pensar que a temperatura relativamente baixa em que se realizaram estes últimos ensaios seria responsável pela falta de um aumento mais pronunciado do título do virus nas fôlhas. Esta suposição concordaria com as observações feitas por RISCHKOV relativas à influência da temperatura na acumulação do virus em fôlhas destacadas. É verdade que também deve ser levado em consideração o fato de que uma das variedades de fumo incluidas nesta série era resistente ao mosáico, e a outra, embora suscetível, não era de todo comparável à variedade *White Burley* empregada nas séries anteriores. E' por isso que fizemos questão de executar ainda mais uma série de experiências, em condições comparáveis às do nosso último

grupo de ensaios, usando, porém, desta vêz, fôlhas da variedade *White Burley*, a mesma que tinha fornecido o material para as 3 primeiras séries de ensaios.

5) Série de ensaios iniciada em 6-5-1944.

Esta série era constituida de 50 fôlhas médias da variedade *White Burley*, distribuidas em dois grupos de número igual de fôlhas. O primeiro grupo compreendia as fôlhas cujo pecíolo mergulhava em água de torneira, e o segundo abrangia as que recebiam uma alimentação suplementar com solução nutritiva de KNOP. A renovação do líquido se efetuou de 3 em 3 dias. O estado de conservação das fôlhas não foi tão satisfatório como na série anterior. O estado anormal das fôlhas patenteou-se menos por um eventual murchamento do limbo do que por um amarelecimento progressivo, que era especialmente nítido no grupo das fôlhas mantidas em água. Êste rápido amarelecimento das fôlhas relacionava-se provàvelmente com a idade mais avançada delas, em comparação com as usadas na série anterior. Conforme a técnica já descrita nos ensaios anteriores, uma metade do limbo de tôdas as fôlhas (A) foi inoculada com uma concentração forte (1/10) do suco contendo virus do mosáico do fumo, ao passo que a outra metade (B) foi friccionada com a solução mais diluida do mesmo suco (1/10.000). A inoculação feita em fôlhas de *Nicotiana glutinosa* com os sucos de fôlhas de fumo logo após a lavagem, no próprio dia do friccionamento com o inóculo, deu também nesta série resultados negativos.

Outras inoculações em fôlhas de *Nicotiana glutinosa* foram executadas com sucos preparados de fôlhas de fumo respectivamente 3, 5, 7, 9, 11, 13, 16, 18, 20 e 23 dias após o friccionamento do limbo delas com o inóculo.

Assim como nas séries anteriores, acompanhamos também nesta parte dos ensaios as flutuações da temperatura e umidade relativa ocorridas no período da experimentação. Não se verificaram durante o decorrer da experimentação oscilações súbitas dêsses dois fatores externos. Os resultados das observações dos ensaios desta série acham-se representados no gráfico 6.

Notamos nesta, como nas séries anteriores, um aumento progressivo da atividade dos sucos, que se caracterizou por surtos periódicos de intensidade sucessivamente crescente. Na série atual, pelo menos nos primeiros 15 dias de observação, os máximos de atividade infecciosa dos sucos se fizeram sentir com maior nitidez do que os mínimos, fato possivelmente relacionado com a grande suscetibilidade

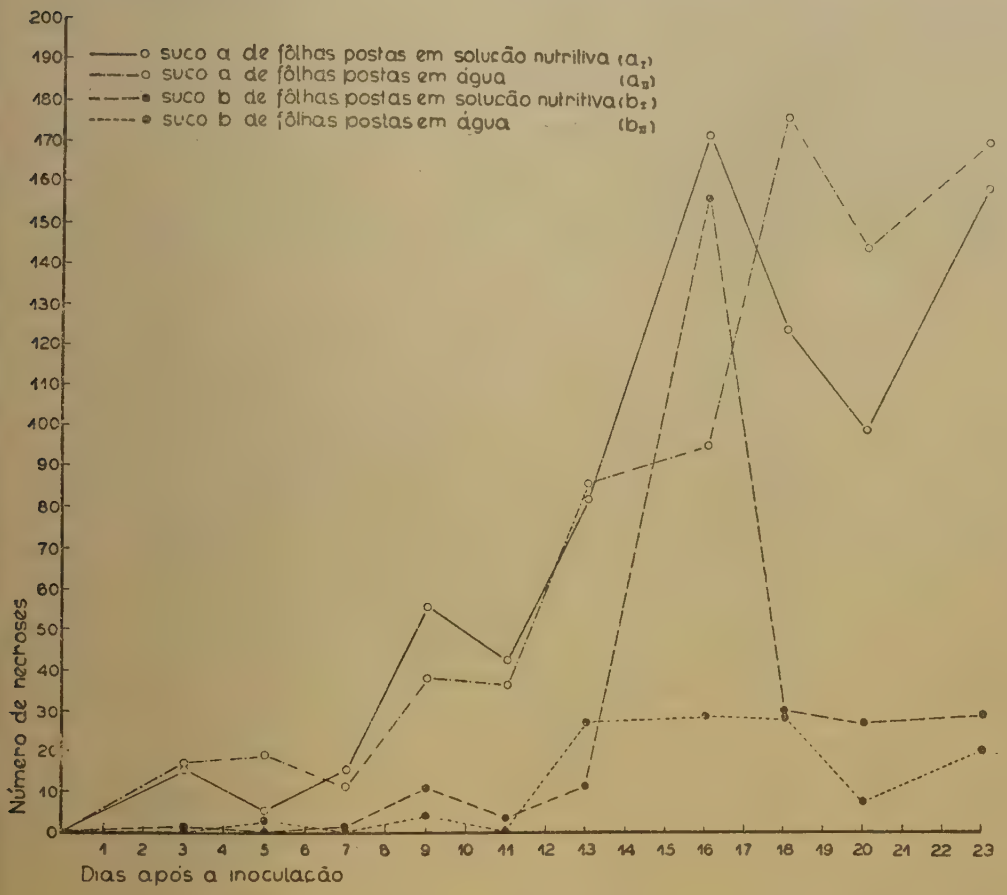


Fig. 6 — Representação gráfica dos resultados da 5.ª série de ensaios, iniciada em 6/4/1944 e executada com sucos de fôlhas da variedade *"White Burley"* de fumo. A metade das fôlhas (I) alimentada em solução nutritiva, a outra metade (II) mantida em água.

da variedade *White Burley* ao mosáico comum do fumo. O maior número de necroses em fôlhas de *Nicotiana glutinosa* foi provocado, nesta série, pelos sucos de fôlhas que tinham sido 16 e 18 dias antes friccionadas com o inóculo. O valor real dêste máximo de atividade foi nìtidamente superior ao verificado na série anterior, em fôlhas de fumo da variedade *Palmira 12*, sem alcançar, porém, inteiramente, o índice correspondente, relativo, nessa mesma série anterior, à variedade *Burley*.

Êste resultado parece, à primeira vista, estranho, por considerarmos a variedade *White Burley* mais suscetível ao mosáico do que a variedade do grupo *Burley*, usada na nossa série 4. Devemos porém levar em consideração a idade já um pouco avançada das fôlhas da variedade *White Burley*, que utilizamos nesta série, idade talvez menos propícia a um aumento rápido da atividade do virus. Em todo caso

não foram verificados, para os sucos testados nesta série, valores muito altos de atividade patogênica. Para explicar êste fenômeno pensamos em diversas fontes de êrro, entre elas uma possível perda de partículas de virus pelo eventual transporte delas para a base da fôlha e ulterior passagem para o líquido da conservação. Para examinar esta possibilidade, friccionamos várias vêzes fôlhas de *Nicotiana glutinosa* com o líquido em que tinham mergulhado as bases das fôlhas inoculadas com o mosáico comum do fumo. Em nenhum caso êste líquido provou ser infeccioso. Não acreditamos, por isso, ter que contar com a possibilidade de perdas de virus pelo transporte de partículas para o líquido de conservação.

Tentando agora focalizar a influência que a alimentação das fôlhas exerce no aumento da atividade do virus, achamos, a êsse respeito, certa semelhança entre as observações desta série e as da anterior. Nos primeiros dias nota-se uma ligeira superioridade nas fôlhas mantidas em água. A partir do 6.º dia, porém, as fôlhas alimentadas com solução nutritiva alcançam índices mais pronunciados da atividade do virus, ao que freqüentemente se seguem baixas igualmente mais acentuadas.

Com respeito ao lapso de tempo necessário para alcançar o máximo da atividade do virus, já tinhamos notado, na série anterior, que freqüentemente as fôlhas que receberam alimentação complementar, estavam de alguns dias adiantadas com relação às apenas providas de água. O mesmo fenômeno pôde também ser observado na série atual. As fôlhas, que dispunham para sua alimentação apenas de água, alcançavam as máximas relativas do título de virus no 5.º, 9.º e 18.º dias após a inoculação, ao passo que as fôlhas postas em solução nutritiva atingiram o respectivo máximo do título, no 3.º, 9.º e 16.º dias após o friccionamento com o inóculo. Merece ser mencionado, ainda, que nas fôlhas alimentadas com água a atividade do virus atingiu finalmente um valor absoluto ligeiramente mais elevado do que nas fôlhas mantidas em solução nutritiva.

Resta-nos apenas esclarecer as diferenças verificadas entre os grupos de sucos *a* e *b*. Em algumas das séries anteriores tivemos ocasião de observar que o índice da atividade do virus nas duas metades do limbo friccionadas com diferentes concentrações do inóculo tendia a se igualar nas últimas datas de observação.

Nesta série, porém, fazia-se sentir até o 23.º dia de observação uma diferença muito acentuada entre o título do virus dos sucos provenientes das metades opostas do limbo. E' verdade que no grupo de fôlhas que tinham recebido alimentação complementar, percebia-se no

16.º dia de observação um considerável aumento do poder infeccioso na metade do limbo friccionada com a concentração mais fraca do inóculo, aumento que quase alcançou o valor da atividade verificado na outra metade do limbo. Mas as observações nos dias seguintes mostraram que êsse aumento era apenas passageiro e não conduziu ao desaparecimento sucessivo da diferença na atividade de virus das duas metades do limbo. Com maior constância ainda se observou essa diferença do título do virus entre as duas metades do limbo no grupo de fôlhas, apenas alimentadas com água. Com efeito, neste grupo a atividade do virus na metade do limbo, que tinha sido friccionada com o inóculo mais concentrado, superava nìtidamente a da outra metade em tôdas as datas de observação. Devemos ainda destacar especialmente a falta de um aumento elevado da atividade do virus na metade B do limbo, das fôlhas postas em água, no período compreendido entre o 13.º e o 23.º dia de observação, isto é, num lapso de tempo que geralmente inclue a fase de um considerável aumento da atividade do virus. Diante da grande importância dêste resultado voltaremos a tratar dêle por ocasião da discussão dos problemas gerais dêste trabalho.

Seria, talvez, de interêsse ainda esclarecer aqui se o fim do nosso período de observação coincide, efetivamente, com o fim da fase de aumento da atividade do virus nas fôlhas examinadas. A ventilação dêste problema nesta altura se impõe porque nem nesta série nem nas antecedentes nos foi possível averiguar se o título do virus nas fôlhas inoculadas sofre de fato um decréscimo considerável e duradouro, após alcançar o seu máximo cêrca de 3 semanas após a inoculação.

Na maioria dos nossos ensaios, é justamente o resultado do último dia de observação que revela o máximo do índice da atividade do virus nas fôlhas. Na série de 6-4-1944, cujos resultados estamos analisando agora, o poder infeccioso do suco preparado das fôlhas inoculadas atingiu o máximo alguns dias antes do fim das observações. O decréscimo da atividade do virus nos últimos dias foi, porém, pouco conspícuo e discontínuo.

Dessa maneira não se podia chegar a uma conclusão definitiva quanto ao caráter das flutuações da atividade do virus verificadas nos últimos dias de observação. Com efeito, elas podem constituir ou o início da diminuição definitiva da atividade do virus, ou pertencer ainda à fase do aumento que, como vimos, é caracterizada também por surtos interrompidos.

De um estudo da literatura, porém, podemos depreender que, provàvelmente, o nosso período de observação de 3 semanas coincidiu com a fase principal de acumulação do virus.

E' verdade que não dispomos de indicações bibliográficas relativas ao aumento do título de virus em fôlhas primeiramente destacadas da planta-mãe e depois inoculadas. Temos que recorrer, por isso, às referências encontradas na literatura, quanto às variações sucessivas do teôr de virus, de plantas inteiras. Devemos um estudo quantitativo desta questão principalmente a STANLEY (16, 1937). Êste autor inoculou, numa determinada data, diversos grupos de plantas de fumo com o virus do mosáico comum, e verificou, em intervalos semanais a partir do dia da inoculação, em um grupo de plantas cada vez, o teôr do suco total em núcleo-proteinas de virus. Podemos inferir das duas tabelas dêsse trabalho de STANLEY, que, realmente, o teôr do suco em proteina específica aumentou durante as 5 semanas que se seguiram ao dia da inoculação das plantas, mas que a maior intensidade dêsse aumento se efetuou já duas ou três semanas após a inoculação. Convém deixar bem claro que nos seus ensaios STANLEY não estudou como nós apenas o comportamento do virus na fôlha inoculada, mas utilizou-se também de todo o resto da planta posteriormente invadida pelo virus.

Isso leva-nos a crer que em fôlhas isoladas a fase do aumento do virus corresponda a um lapso de tempo ainda mais reduzido.

Esta nossa suposição encontra forte apoio nos resultados a que chegaram, em estudos semelhantes, MARTIN, BALLS e MCKINNEY (5, 1939). Também êstes autores trabalharam com plantas inteiras, cada uma das quais foi inoculada, em duas fôlhas basais, com o mosáico comum do fumo. Nestes estudos, porém, foram avaliadas, separadamente, as variações no teôr de virus das fôlhas "baixas", isto é, das fôlhas inseridas diretamente acima das inoculadas, e das fôlhas "apicais". Verificou-se então que nas fôlhas baixas o teôr de proteina específica atingiu o máximo já 5 dias após a inoculação das plantas, ao passo que nas fôlhas apicais êsse aumento só chegou ao máximo 5 dias mais tarde. Podemos mencionar, ainda, que em estudos semelhantes ROSS (10, 1941), também trabalhando com plantas inteiras do fumo, que tinham sido, porém, infeccionadas com o mosáico da alfafa, verificou que o suco destas plantas atingiu o máximo da atividade 11 ou 12 dias após a inoculação. Conforme êsses resultados poder-se-ia crer que na própria fôlha inoculada o aumento do virus se efetuava num período ainda menor. Algumas observações de SPENCER (11, 1941), entretanto, mostram que essa hipótese não cor-

responde à realidade. Êste autor visou, nos seus estudos, a verificação das alterações que na própria fôlha inoculada tanto o teôr de proteina específica como a atividade do virus sofrem nas fases sucessivas da infecção com o mosáico do fumo.

Provou SPENCER nesses estudos, que na própria fôlha inoculada, pelo menos quando esta estiver ainda em conexão orgânica com a planta-mãe, a proteina específica só atinge o máximo 20 dias após a inoculação. Referindo-se à atividade patogênica desta proteina, o mesmo autor esclareceu que uma determinada quantidade de virus, isolada de fôlhas recém-inoculadas, possue uma atividade nítidamente inferior à da mesma quantidade de virus obtida de fôlhas infeccionadas há mais tempo. Isso quer dizer que nas fôlhas inoculadas se verifica, durante os 20 dias seguintes à inoculação, um aumento tanto da quantidade como da atividade do virus.

Dêstes dados da literatura podemos tirar algumas conclusões que nos facilitam a melhor interpretação dos nossos próprios ensaios. Se, de fato, na fôlha inoculada se verifica um aumento tanto da quantidade como da atividade do virus, o teste biológico empregado nos nossos estudos para a avaliação do título de virus das fôlhas examinadas não basta para a diferenciação entre êsses dois tipos de incremento. E' possível que os altos valores de infectividade verificados por nós com relação a fôlhas que tinham sido inoculadas cêrca de 20 dias antes com o mosáico comum do fumo, devem ser atribuidos mais à atividade considerável do virus nessas fôlhas do que a um aumento constante da quantidade dêsse virus.

Considerando que o aumento da quantidade de virus observado por SPENCER durante um período apenas de 20 dias, se referiu a fôlhas ainda inseridas na planta, achamos, de fato, provável, que em fôlhas destacadas êsse aumento abrangeria um lapso de tempo ainda menor. Neste caso, as nossas observações, feitas nos últimos dias de cada série, revelariam apenas o aumento da atividade de uma certa quantidade de virus já existente na fôlha. Julgamos assim ter razões para crer que o período de observação de 20 dias, adotado nos nossos ensaios, compreendeu, de fato, a fase da multiplicação ativa do virus nas fôlhas inoculadas, e que ao estender os nossos estudos a um período mais dilatado teriamos anotado um decréscimo definitivo da atividade do virus. Com estas considerações vamos, pois, encerrar a interpretação do gráfico 6 e unicamente tentar ainda resumir alguns resultados que se referem à totalidade dos ensaios.

Entre as observações das séries até agora expostas achamos de importância mais geral os seguintes resultados:

1) Em fôlhas de fumo inoculadas com o mosáico comum após a sua separação das plantas-mães, verifica-se, nas 3 semanas subseqüentes à inoculação, um aumento do título do virus.

2) Êste aumento, pelo menos quando avaliado, como no nosso caso, por métodos biológicos, é discontínuo.

3) Geralmente a concentração de virus do inóculo inicial exerce nítida influência no mecanismo do aumento da sua atividade, pois a metade do limbo inoculada com a concentração mais forte do virus forneceu sucos que provaram ser, dentro do período da nossa experimentação, mais ativos do que os sucos correspondentes, obtidos da outra metade do limbo.

4) Esta relação positiva entre a concentração do inóculo e o aumento da atividade do virus nas fôlhas mostrou-se apenas velada, a partir do 16.º dia de observação, nas experiências executadas com a variedade de fumo *Palmira 12*, que é considerada como altamente resistente ao virus do mosáico do fumo. O traçado geral das curvas correspondentes ao aumento da atividade do virus em fôlhas destacadas não se mostrou essencialmente modificado pela maneira da alimentação das fôlhas e nem pelas oscilações das condições externas durante a experimentação.

II) Ensaios executados com plantas inteiras.

Com êstes ensaios, que constituiam apenas um complemento dos executados com fôlhas destacadas, esperavamos poder contribuir para esclarecer se a concentração de virus do inóculo exerce ou não uma influência na severidade dos sintomas apresentados pela planta. O esquema geral das experiências realizadas com plantas intactas já foi exposto à pág. 101. Êstes ensaios serviram pois para a comparação dos sintomas, produzidos em plantas de determinadas variedades de fumo por diluições sucessivas de um suco chamado "normal", contendo o virus do mosáico comum do fumo. Êste suco normal de virus, que serviu em tôdas as séries de ensaios como ponto de partida para as diluições, foi obtido triturando-se no almofariz fôlhas doentes de fumo com um volume de água distilada igual ao peso fresco dessas fôlhas. Êste suco foi depois passado através de um pedaço de etamine e colhido em pequenas placas de Petri esterilizadas.

Por ocasião da avaliação dos resultados das primeiras séries de ensaios, verificamos que plantas de fumo, inoculadas com diluições inferiores a 1/1.000, reagem freqüentemente à infecção por sintomas não distinguíveis dos causados pelo próprio suco normal. Podemos, assim, nos limitar à apresentação dos dados das séries que incluem pelo menos diluições de 1/1.000 a partir do suco normal.

1) Série de ensaios efetuada em 18-11-1943.

Grupos de 5 plantas novas e sadias de cada uma das variedades de fumo "*Havana*" e "*Geudertheimer*" foram inoculados (por friccionamento de uma fôlha) respectivamente com as diluições 1/10, 1/100 e 1/1.000 do suco "normal" contendo mosáico comum do fumo.

Observações comparativas quanto à severidade dos sintomas provocados nestes vários grupos de plantas foram anotadas em 4/12, 10/12 e 28/12/43.

Reunimos na tabela seguinte os resultados das observações finais de 28/12/1943.

TABELA 1

Relação existente entre a concentração do inóculo e a severidade dos sintomas.

Variedade de fumo	Concentração do suco contendo virus	N.º de plantas inoculadas	N.º de plantas bem desenvolvidas	N.º de plantas "atrazadas" ("stunted")	N.º de plantas com fôlhas mostrando "bolhosidades"	N.º de plantas com fôlhas novas deformadas	N.º de plantas sem sintomas
Havana	1/10	5	0	5	4	5	0
	1/100	5	2	3	5	4	0
	1/1000	5	4	1	3	1	1
Geudertheimer . .	1/10	5	3	2	5	5	0
	1/100	5	4	1	5	5	0
	1/1000	5	3	2	4	3	0

Apesar do número reduzido de plantas incluidas nesta série de ensáios, já podemos tirar dos dados da tabela 1 algumas conclusões interessantes. A existência de uma relação entre a concentração de virus do inóculo e a severidade dos sintomas se faz sentir mais nitidamente nas plantas inoculadas da variedade *Havana* do que nas da variedade *Geudertheimer*. Podemos ver, por exemplo, que a totalidade das plantas da variedade *Havana* inoculadas com o suco 1/10 ficou impedida no crescimento, ao passo que 80% das plantas correspondentes, inoculadas com suco 1/1.000, continuaram a ter um desenvolvimento normal após a inoculação.

Outro sintoma, que se presta bem para a avaliação da relação existente entre a concentração de virus do inóculo e a severidade da expressão da doença é o aparecimento de fôlhas deformadas. Vemos da nossa tabela, que de fato, nas plantas inoculadas da variedade *Havana*, o número de plantas que apresentam fôlhas deformadas dimínue com o grau da diluição do inóculo.

Ao focalizar estas diferenças entre plantas tratadas com diversas diluições do inóculo, devemos admitir que seria prematuro generalizar êsses resultados. Como se pode inferir dos próprios dados da tabela, já com as plantas inoculadas da variedade *Geudertheimer* não conseguimos estabelecer, com a mesma segurança, relações nítidas entre a concentração de virus do inóculo e a severidade dos sintomas. E mesmo as observações relativas à variedade *Havana* se referem a plantas cultivadas em vasos relativamente pequenos, o que quer dizer que as plantas dispunham apenas de limitada quantidade de terra. E' possível que em plantas desenvolvidas em condições mais favoráveis as diferenças entre os sintomas das plantas tratadas com diversas diluições do inóculo teriam desaparecido. Apesar de tudo, julgamos dever atribuir certa importância à facilidade com que conseguimos, na série de plantas de fumo da variedade *Havana*, ainda 6 semanas após a inoculação e só baseando-nos na severidade dos sintomas, encontrar diferenças entre os lotes tratados com diversas diluições do inóculo.

2) Série de ensáios efetuada em 30/12/1943.

Nesta série as plantas a serem inoculadas foram divididas em 6 grupos, cada um dos quais foi composto de 5 plantas da variedade de fumo denominada "*Buga*", e de 3 da variedade "*White Burley*". Como já explicamos na introdução dêste trabalho, a primeira destas variedades é considerada como possuidora de certa resistência ao mosáico do fumo, ao passo que a segunda é muito suscetível a êste virus.

Os 6 grupos de plantas experimentais foram inoculados, respectivamente, com o suco "normal" e com as diluições 1/10, 1/100, 1/10.000 e 1/100.000 dêste suco em água distilada.

Nas observações feitas em 3/2/44, isto é, 5 semanas após a inoculação, verificamos que 4 plantas da variedade "*Buga*", inoculadas com a maior diluição do suco, tinham escapado à infecção. Por outro lado, tôdas as plantas da variedade "*Buga*", uma vez infeccionadas, mostraram o mesmo quadro sintomatológico, independentemente da concentração do inóculo com que tinham sido tradadas. Os sintomas de mosáico apresentados por esta variedade consistem apenas na formação de manchas nas fôlhas, de um matiz verde-claro, contrastando com as faixas escuras que acompanham as nervuras primárias e secundárias. Não observamos, porém, nesta variedade, nem bolhosidades nas fôlhas ("blistering") nem deformação do limbo.

Quanto aos resultados, conseguidos nesta série de ensáios com as plantas da variedade "*White Burley*", de fato, pudemos nelas veri-

ficar diferenças na severidade dos sintomas, correspondentes à concentração de virus do inóculo empregado. Queremos aqui mencionar apenas o fato de que das 3 plantas da variedade *"White Burley"*, inoculadas com a diluição do suco 1/100.000, só uma exibiu, em 3/2/44, o sintoma de "bolhosidades" ("blistering"), ao passo que as duas outras plantas inoculadas com a mesma diluição apresentaram apenas um mosqueado fraco.

Êste fato merece ser destacado, porque as plantas desta variedade, inoculadas com as concentrações mais fortes do virus, reagiram à infecção não só pela diferenciação de extensas "bolhosidades" na superfície das fôlhas, mas também por deformação e reduções do limbo.

Assim, pode-se inferir das observações desta série, que as variedades resistentes ao mosáico se prestam menos do que as suscetíveis, para estudos que visem a obtenção de graus sucessivos de intensidade na expressão dos sintomas.

Êste resultado foi confirmado por um ensáio efetuado em 25/4/44 com a variedade resistente *"Palmira 12"*.

Nesta série de experiências formamos 4 grupos de plantas a serem inoculadas, sendo cada grupo composto de 10 plantas. As inoculações nestes ensáios foram executadas com as diluições 1/10, 1/10.000, 1/100.000 e 1/1.000.000 do suco infectivo normal.

Na observação, feita em 31/5/44, averiguamos que tôdas as plantas desta espécie, uma vez infeccionadas, exibiram os mesmos sintomas brandos, que consistiam numa clorose opaca generalizada das fôlhas, num mosqueado fraco sem "bolhosidades" e numa ligeira ondulação dos bordos das fôlhas.

A fotografia (fig. *C*, estampa 10), tirada em 30/5/1944, mostra uma planta típica de cada um dos grupos de plantas inoculadas com as diluições sucessivas do virus. Nota-se bem que os sintomas apresentados por estas quatro plantas são muito semelhantes entre si e de um caráter bastante brando.

Diante dêsses resultados achamos mais interessante trabalhar, nos ensáios seguintes, com variedades de fumo suscetíveis ao mosáico comum, aplicando nelas diluições extremamente altas do inóculo.

3) Série de ensáios efetuada em 8/3/1944.

Quatro grupos de dez plantas sadias de fumo da variedade *White Burley* foram inoculados respectivamente com as diluições 1/10, 1/10.000, 1/100.000 e 1/1.000.000 de um suco normal.

Em 25/4/44, isto é, sete semanas após a inoculação, anotamos o número de plantas de cada grupo que apresentavam sintomas graves

de mosáico. Consideramos neste caso "graves" os sintomas exibidos pelas plantas em que se notava uma redução do limbo das fôlhas novas. Resumimos os resultados destas observações na nossa tabela 2.

TABELA 2

Severidade dos sintomas apresentados por plantas de fumo da variedade *"White Burley"* inoculadas com diferentes diluições sucessivas de um suco contendo o virus do mosáico comum do fumo.

Diluições do inóculo	N.º de plantas inoculadas	N.º de plantas que apresentaram redução do limbo das fôlhas
1/10	10	7
1/10.000	10	4
1/100.000	10	2
1/1.000.000	10	0

Pode-se depreender facilmente dos dados desta tabela que o número de plantas que apresentavam sintomas graves da doença diminuiu sensivelmente à medida que o grau de diluição do inóculo empregado aumentou.

Queremos ilustrar a influência que nesta série de ensáios a concentração de virus do inóculo exerceu no caráter dos sintomas, com duas fotografias (fig. *D* e *E*, estampa 10). As 4 plantas escolhidas para a primeira destas fotografias representam os 4 grupos de plantas que tinham sido inoculados com diluições progressivas do virus. E' bem evidente que só as duas plantas à esquerda, isto é, as plantas inoculadas com as concentrações 1/10 e 1/10.000, respectivamente, do suco "normal", apresentam deformações e reduções do limbo, sintomas considerados por nós como "severos".

Excusado é admitir que só pode ser atribuida certa importância às diferenças dos sintomas entre as plantas dos diversos grupos, se tais plantas se caracterizarem dentro do mesmo grupo por sintomas relativamente uniformes. Que, de fato, os sintomas apresentados por plantas do mesmo grupo são, até certo ponto, semelhantes entre si, mostra a outra fotografia (fig. *E*, estampa 10), relativa a esta mesma série de ensáios.

Vemos, representadas na fileira superior da fotografia, 5 plantas do grupo que tinha sido inoculado com o suco mais diluido, e cujo aspecto normal contrasta nitidamente com o das 5 plantas da fileira inferior, representantes do grupo que tinha recebido um tratamento com o suco mais concentrado.

Acreditamos, por isso, que não pode haver dúvida em que pelo menos dentro das condições da nossa experimentação, se fêz sentir, ainda na 7.ª semana depois da inoculação das plantas, certa influência da concentração em virus do inóculo no caráter e na severidade dos sintomas apresentados pelas plantas experimentais.

DISCUSSÃO

A) A importância teórica da relação existente entre a concentração de virus do inóculo e a multiplicação do agente infeccioso nas fôlhas.

Verificamos, nas nossas experiências executadas com fôlhas destacadas de plantas de fumo, que as duas metades do limbo de uma fôlha, inoculadas com diversas concentrações do virus do mosáico comum, apresentavam nítidas diferenças nas alterações do título de virus durante as três semanas que se seguiram à inoculação.

Em algumas séries complementares de inoculações efetuadas em plantas inteiras observamos também a existência, sob certas condições externas, de uma correlação direta entre a concentração de virus do inóculo e a severidade dos sintomas apresentados pela planta, mesmo 2 meses após a inoculação.

À primeira vista, êsses resultados parecem estar em contradição com a qualidade autocatalítica, atribuida por STANLEY e outros autores, aos virus e principalmente ao virus do mosáico comum do fumo.

Assim, por exemplo, DOERR (2, 1938, pág. 36) na sua exposição da teoria de STANLEY relativa ao mecanismo da multiplicação do virus na planta, admite como causa desta multiplicação um distúrbio do metabolismo protéico da célula da planta hospedeira sob um impulso "oligodinâmico". Êste impulso é assim chamado porque mesmo quantidades mínimas do inóculo são suficientes para provocar o desvio patológico total do metabolismo. Seguindo conseqüentemente esta idéia, chega-se à suposição de que o processo de multiplicação de virus nas plantas obedece à lei de "tudo ou nada" (Vide KAUSCHE, 4, 1937).

De acôrdo com essa lei, o mesmo efeito da infecção, isto é, o efeito máximo, é provocado por tôdas as diluições do inóculo que ainda sejam capazes de ação patológica. Inoculando, pois, as duas metades do limbo de uma fôlha com diluições diversas do virus, deviamos encontrar, após certo lapso de tempo, o mesmo teôr de virus nos lados opostos da fôlha. Se se quizesse harmonizar os nossos resultados com êste postulado poder-se-ia admitir que a concentração de virus nas duas metades do limbo alcançaria o mesmo valor só após um lapso de

tempo bastante superior ao levado em consideração nos nossos próprios ensáios.

Cremos, porém, já ter demonstrado pelas indicações da literatura referida no fim da parte I dêste trabalho, que a multiplicação do virus do mosáico comum do fumo em fôlhas se efetua geralmente com grande rapidez e que não há, absolutamente, razões para admitir que na própria fôlha inoculada o aumento do teôr de virus continuasse durante mais de 20 dias. Queremos sòmente aqui lembrar mais uma vez o fato de terem encontrado MARTIN, BALLS e MCKINNEY (5, 1939), nos seus estudos das alterações da proteina em plantas atacadas pelo mosáico, o máximo do teôr de virus já 5 dias após a inoculação e isso não nas próprias fôlhas inoculadas mas sim em fôlhas inseridas acima delas. Merece também ser mencionado aqui, que STANLEY, (16, 1937), fazendo um cálculo aproximado da velocidade do aumento do virus em fôlhas de fumo inoculadas com o virus do mosáico comum, chegou à conclusão de que a quantidade introduzida nas células das fôlhas aumentaria dentro dos primeiros 4 dias, 1 milhão de vêzes.

Diante dessas referências da literatura, que corroboram a noção de uma multiplicação muito rápida do virus em fôlhas, acreditamos que as diferenças no índice do teôr de virus encontradas por nós entre duas metades do limbo que tinham sido friccionadas com diversas diluições do inóculo, não podem ser atribuidas ao prazo curto de observação, mas revelam, com efeito, a grande influência que a concentração do inóculo em virus exerce no processo e no resultado do aumento de virus nas fôlhas.

Ao admitir esta influência, devemos, pois, abandonar, ou pelo menos modificar a teoria, formulada por DOERR, quanto ao caráter "oligodinâmico" do impulso que conduz à multiplicação do virus em fôlhas e à validade da lei de "tudo ou nada" para o caso da multiplicação de virus em fôlhas.

Antes de tirar, porém, das nossas experiências, conclusões de tão grande alcance, devemos examinar os fundamentos experimentais dos nossos resultados.

B) Avaliação dos nossos resultados.

Vamos, portanto, primeiro, destacar aqui todos os fatores que podem ser tomados como pontos de partida para uma crítica dos nossos resultados. Devemos mencionar entre êsses fatores, principalmente, o número relativamente limitado de ensáios que pudemos executar e a grande variação introduzida por nós na técnica da experimentação, mesmo nestes poucos ensáios. Outro ponto que deve ser frizado aqui é o fato de termos acompanhado, nos nossos ensáios o

processo de aumento do virus nas fôlhas inoculadas de fumo, apenas por meio de métodos biológicos e não por métodos químicos. Desta maneira os nossos resultados não são imediatamente comparáveis com aqueles dos citados trabalhos de STANLEY (16, 1937), MARTIN, BALLS e MCKINNEY (5, 1939) e SPENCER (11, 1941), cujo principal objeto consistiu em acompanhar o aumento da núcleo-proteina de virus em plantas inoculadas, por meio de determinações químicas da proteina recém-formada. As nossas avaliações relativas ao título de virus das fôlhas de fumo inoculadas, baseiam-se inteiramente no teste biológico, isto é, na capacidade do suco preparado destas fôlhas, de produzir necroses locais nas fôlhas de *Nicotiana glutinosa*, inoculadas com êsse suco. Da literatura muito extensa dedicada à apreciação do valor dêste teste pode-se inferir que provavelmente não existe uma relação fixa e simples entre o número dessas lesões e a concentração em virus da solução ensaiada. Em dois trabalhos recentes SPENCER e PRICE (12 e 13, 1943 *a* e *b*) reunem as referências de literatura a êste assunto e expõem um processo que permite, contornando esta inconveniência do teste biológico, chegar a avaliações bastante exatas da atividade do virus do mosáico do fumo. O método idealizado por SPENCER e PRICE consiste, essencialmente, na comparação de 3 diluições de uma solução "standard" do virus. Com os dois sucos a serem comparados e que possuem o mesmo grau de diluição, friccionam-se, segundo êste processo, as duas metades opostas do limbo de uma fôlha primária de *Phaseolus vulgaris* var. *Eearly Golden Cluster*.

No nosso estudo não pretendiamos obter indicações exatas quanto ao teôr absoluto em virus das fôlhas inoculadas, mas visamos apenas uma comparação da atividade patogênica de sucos, obtidos das duas metades do limbo das fôlhas inoculadas. Achamos por isso que já uma variante mais simples dêste teste biológico poderia satisfazer as nossas exigências.

Assim baseamos as avaliações da atividade patogênica dos sucos a serem examinados, no número de necroses produzido pelo respectivo suco em fôlhas de *N. glutinosa* e não de *Phaseolus vulgaris*. Para eliminar as possíveis variações no número das necroses, devidas a diferenças de suscetibilidade ao virus do mosáico comum do fumo entre diversas plantas desta espécie ou entre as diversas fôlhas da mesma planta, testamos cada suco a ser examinado, como já foi exposto à pág. 101, de acôrdo com o processo elaborado e recomendado por YOUDEN e BEALE (18, 1934), em uma fôlha de 5 plantas de *Nicotiana glutinosa*, providas de 5 fôlhas.

Cada grupo de 5 plantas de *Nicotiana glutinosa* possibilitou assim, nos nossso ensáios, a comparação da atividade de virus de 4 diferentes sucos, visto que deixamos sempre uma fôlha de cada planta sem tratamento, para que pudesse servir de testemunha. O número limitado de plantas de *Nicotiana glutinosa* de que dispunhamos para estas experiências não nos permitiu obedecer à recomendação de SPENCER e PRICE, de estudar a atividade de cada suco em 3 diluições diferentes. Examinamos, porém, nas nossas 3 primeiras séries de ensáios, pelo menos duas diluições de cada suco, sem obter aliás, com êsses dois diversos graus de diluição dos sucos, resultados essencialmente diferentes entre si.

Apesar dos limites que dessa maneira nos foram traçados pela escassez do nosso material, e de tôdas as imperfeições aqui caracterizadas, da nossa técnica, acreditamos que os principais resultados por nós obtidos merecem consideração.

Para o demonstrar vamos examinar mais uma vez os dados relativos à nossa 5.ª série de ensáios, cuja representação gráfica já foi exposta e comentada à pág. 116-122. Queremos recorrer de novo a êstes dados apenas para verificar até que ponto é justificável o fato de admitirmos que a concentração do inóculo influe nitidamente no mecanismo do aumento do poder infeccioso do virus em fôlhas. E' por isso que na tabela 3 apresentamos os dados de maneira que permite a comparação fácil entre os índices da atividade dos sucos preparados dos lados opostos do limbo das fôlhas inoculadas. A tabela compreende dois grupos de colunas, referindo-se o primeiro às fôlhas mantidas em solução nutritiva, ao passo que o segundo abrange os dados relativos às fôlhas conservadas em água. Nas duas primeiras colunas de cada grupo encontram-se os valores correspondentes ao número médio de necroses que os sucos, preparados das duas metades do limbo, provocaram nas diversas datas de observação em fôlhas de *Nicotiana glutinosa*.

Na terceira coluna de cada metade da tabela podem-se notar os valores da diferença (D), existente em cada data de observação, entre o número médio das necroses produzido pelos dois sucos comparados (*a* e *b*). A-fim-de melhor avaliar a significação estatística dessas diferenças, calculamos para cada valor desta coluna o Êrro Padrão correspondente, de acôrdo com a fórmula

$$E_D = \sqrt{\frac{\sigma_1^2}{n_1} + \frac{\sigma_2^2}{n_2}}$$

, em que E_D significa o Êrro Padrão

da diferença entre as duas médias, ao passo que $\frac{\sigma_1^2}{n_1}$ representa o quadrado do Êrro Padrão da primeira média (encontrada na primeira coluna) e $\frac{\sigma_2^2}{n_2}$ o quadrado do Êrro Padrão da segunda média (encontrada na segunda coluna). Os valores do Êrro Padrão das diferenças entre as médias obtidos com essa fórmula acham-se reunidos na coluna 4 de cada grupo da tabela.

Finalmente anotamos na coluna 5 os valores do quociente entre a diferença das médias e o seu respectivo Êrro $\left(\frac{D_{(a-b)}}{E_D}\right)$, isto é, de t.

Comparando êsses quocientes com os valores de $t = 2{,}306$ e $t = 3{,}355$, que se referem a 8 graus de liberdade e uma probabilidade de 0,05 respectivamente 0,01, chegamos à conclusão que algumas das nossas diferenças são significativas ou até altamente significativas. Êsses dois grupos estão marcados por * e ** na coluna 3 da nossa tabela.

Examinando, então, os dados reunidos na tabela 3, compreendemos que os sucos preparados das duas metades do limbo das fôlhas, que tinham sido inoculadas com diferentes concentrações do virus, mostraram, quando testados dentro dos 11 dias subseqüentes à inoculação, diferenças que são (com uma única exceção) estatisticamente significativas e em grande parte altamente significativas. Isso quer dizer que, pelo menos nas nossas condições de experimentação, o mecanismo da acumulação de virus em fôlhas de fumo destacadas da planta, foi, durante um lapso de tempo de 11 dias, seguramente influenciado pela concentração do inóculo original. A êste primeiro período de 11 dias segue-se um prazo de 9 dias, em que as diferenças entre os índices da atividade dos sucos nem sempre se revelaram significativas. Na última data de observação, porém, isto é, 23 dias após o friccionamento das fôlhas com as duas concentrações do inóculo, obtivemos outra vez diferenças altamente significativas entre os índices da atividade dos sucos, preparados das duas metades do limbo, tanto na série de fôlhas mantidas em solução nutritiva como naquela de fôlhas mantidas em água. Achamos que êste resultado merece ser especialmente destacado, por documentar a nítida influência que a concentração do inóculo exerce no mecanismo do aumento da atividade do virus em fôlhas até numa fase mais adiantada dêste processo.

Sabemos perfeitamente que êste resultado se refere a um caso especial de multiplicação do virus e não pode ser aplicado, sem a devida reserva, a outros casos. Nas nossas próprias experiências, executadas

TABELA 3

A influência da concentração do inóculo no mecanismo da multiplicação do virus em fôlhas de fumo, demonstrada nos dados da 5.ª série de ensaios relativos a fôlhas destacadas (experiências iniciadas em 6/5/1944).

Suco das fôlhas de fumo que foram mantidas turgescentes após a inoculação, durante	Número de necroses produzidas em fôlhas de *Nicotiana glutinosa* por suco de fôlhas de fumo *"White Burley"* inoculadas com o virus do mosáico.									
	Suco das fôlhas de fumo mantidas em solução nutritiva					Suco das fôlhas de fumo mantidas em água				
	Suco *a* (da metade do limbo friccionada com o inóculo 1/10)	Suco *b* (da metade do limbo friccionada com o inóculo 1/10000)	$D_{(a-b)}$	E_D	$\frac{D_{(a-b)}}{E_D}$	Suco *a* (da metade do limbo friccionada com o inóculo 1/10)	Suco *b* (da metade do limbo friccionada com o inóculo 1/10000)	$D_{(a-b)}$	E_D	$\frac{D_{(a-b)}}{E_D}$
3 dias . . .	16,4	1,4	15,0**	3,32	4,53	17,0	0,2	16,8**	3,14	5,35
5 dias . . .	5,8	0,2	5,6**	0,88	6,36	19,8	3,4	16,4**	3,66	4,48
7 dias . . .	15,8	1,2	14,6**	2,19	6,66	11,0	0,6	10,4	5,53	1,88
9 dias . . .	56,0	11,2	44,8*	16,54	2,55	38,4	4,6	33,8*	10,60	3,17
11 dias . . .	42,6	3,2	39,4**	8,51	4,63	37,0	0,6	36,4**	4,97	7,33
13 dias . . .	83,0	11,6	71,4*	30,90	2,31	86,4	27,8	58,6	57,49	1,02
16 dias . . .	173,0	157,4	15,6	69,02	0,23	95,8	29,2	66,6	30,93	2,15
18 dias . . .	125,0	29,6	95,4	53,57	1,78	177,0	29,2	147,8*	62,88	2,35
20 dias . . .	100,4	27,6	72,8	43,90	1,65	145,2	8,4	136,8**	36,25	3,77
23 dias . . .	160,2	29,2	131,0**	25,31	5,17	172,6	21,2	151,4**	39,56	3,82

com a variedade resistente de fumo "*Palmira 12*" (série 4a), verificamos que as diferenças entre os índices da atividade dos dois sucos só mostraram valores consideráveis nas duas semanas que se seguiram à inoculação. Nas observações executadas na 3.ª e 4.ª semana a partir da inoculação, os sucos preparados da parte do limbo que tinha sido friccionada com a solução mais diluida do virus demonstraram quase a mesma ou até uma maior atividade do que os fornecidos pela outra metade do limbo. Achamos, porém, que êste caso, por se referir à uma variedade de fumo considerada "resistente" ao mosáico, constitue justamente a exceção que confirma a regra.

Isso nos leva a tentar explicar, de maneira mais concreta, a influência da concentração do inóculo no mecanismo da multiplicação do virus em fôlhas. Ao friccionar uma fôlha de fumo com um inóculo que contém numerosas partículas de virus, um número relativamente grande dessas partículas conseguirá invadir células da planta hospedeira. Assim, é provável que em nenhuma parte do limbo haja áreas extensas sem grupos de células invadidas. As distâncias relativamente pequenas entre duas células invadidas podem ser percorridas por meio do transporte do virus de célula para célula e isso com tanto maior rapidez quanto mais permeáveis sejam para as partículas do virus as células e as suas membranas.

Achamos possível que em células novas êsse transporte se realize com especial facilidade.

Por outro lado, na fôlha que foi friccionada com uma solução pobre em partículas de virus, poucas destas partículas têm probabilidade de invadir uma célula. Podemos concluir, pois, que as distâncias médias entre duas células invadidas são relativamente grandes. Muitas das células, inicialmente não invadidas, progridem no seu crescimento de distensão, antes de serem atingidas por partículas do virus.

Dessa maneira, numa fôlha, em que inicialmente só poucas células foram invadidas por partículas do virus, o teôr de virus manter-se-á, durante muito tempo, num baixo nível.

A teoria aqui aventada nem leva ainda em consideração a possibilidade de ser influênciada, até na própria célula invadida, a velocidade da multiplicação do virus pela quantidade do virus que penetrou na célula (KAUSCHE, 4, 1937).

Temo-nos referido, até agora, exclusivamente ao mecanismo da multiplicação de virus em fôlhas de variedades de fumo conside-

radas suscetíveis ao mosáico. Em plantas resistentes, provavelmente tôdas as células, mesmo as meristemáticas, oferecem certo obstáculo à penetração e à multiplicação das partículas do virus. Assim em fôlhas de variedades resistentes, as partículas de virus levam bastante tempo para atravessar até pequenas ilhotas de tecido inicialmente não invadido. Com relação ao lento processo de multiplicação de virus, as fôlhas de variedades resistentes, inoculadas com concentrações fortes de virus, comportam-se então de maneira semelhante a fôlhas de variedades suscetíveis, quando inoculadas com concentrações fracas do mesmo virus. Segundo esta idéia, deve-se esperar, conseqüentemente, que em fôlhas de variedades resistentes a concentração do inóculo exerça uma influência menos acentuada no mecanismo da multiplicação do virus do que em fôlhas de variedades suscetíveis. De fato, achamos nas nossas experiências executadas com a variedade resistente *"Palmira 12"*, uma certa analogia entre os índices de atividade relativos aos sucos obtidos dos dois lados opostos do limbo.

Achamos possível que exista, mesmo nas variedades de fumo suscetíveis ao mosáico, um fator regulador da multiplicação excessiva do virus; não estranhariamos se êsse fator fôsse responsável pelas flutuações alternativas do teôr de virus das fôlhas, que verificamos freqüentemente nas nossas experiências.

Resta-nos ainda esboçar, em largos traços, as prováveis relações existentes entre o teôr de virus e o caráter dos sintomas. Os poucos ensáios que pudemos executar a êste respeito e que serviram apenas para a nossa orientação, parecem indicar que certos sintomas graves do mosáico só se manifestam após inoculação das plantas com concentrações massiças do virus. Cremos poder atribuir certo valor a essas observações ainda preliminares, porque também outros autores verificaram, ultimamente, a existência de relações bastante acentuadas entre a dosagem do inóculo e o caráter dos sintomas. Queremos relatar aqui alguns resultados a que chegou KAUSCHE (4, 1937) em estudos de inoculação executados com a mistura de duas variantes do virus X da batatinha. Esta mistura, quando aplicada em concentrações massiças sôbre fôlhas de fumo, produzia sintomas anulares necróticos (chamados sintomas primários) nas fôlhas diretamente friccionadas, e dois tipos de sintomas sistémicos (chamados sintomas secundários e sintomas finais) nas fôlhas novas. No trabalho citado, KAUSCHE realizou grandes séries de inoculações com diluições sempre crescentes do inóculo e verificou que os sintomas primários só apare-

ceram em conseqüência de inoculações efetuadas com concentrações fortes do virus e que também o aparecimento dos sintomas secundários dependia da aplicação de concentrações ainda elevadas (embora inferiores às necessárias para a produção dos sintomas primários) do virus causador. Inoculando as plantas com uma diluição bastante alta, o autor conseguiu apenas provocar sintomas finais nas plantas infeccionadas. Êle explica êsse fato aventando a hipótese de uma transformação progressiva da proporção existente entre substância vegetal e quantidade do virus, transformação processada em desfavor desta última em plantas inoculadas com doses muito fracas do virus. Além disso, admite que as células que não são logo invadidas por concentrações fortes do virus percam no curso do seu desenvolvimento a capacidade de reagir à infecção por sintomas primários.

Estas teorias lembram em muitos pontos as idéias aqui por nós expostas acêrca da importância que a concentração do inóculo exerce não só no mecanismo da multiplicação do virus mas também no caráter dos sintomas. Também em trabalhos recentes relativos a outras doenças de virus foi demonstrado que a maneira da manifestação da doença depende grandemente da quantidade do inóculo introduzida na planta. Assim McKINNEY e CLAYTON (7, 1944) verificaram, em estudos executados com a doença "ringspot" do fumo, que as plantas de *Nicotiana tabacum* só produziram sintomas agudos da doença após a sua inoculação com quantidades grandes de virus. Por isso, queremos crer que as referências da literatura e os nossos próprios resultados justificam a idéia de que se deve ter precaução em não exagerar o sentido da teoria da multiplicação autocatalítica do virus sob impulsos oligodinâmicos. Mesmo aceitando esta teoria, deve-se sempre ter em mente que a dose do inóculo introduzida na planta exerce uma nítida influência no mecanismo da multiplicação do virus e no caráter dos sintomas que a planta provavelmente exibirá.

SOME OBSERVATIONS ON THE MECHANISM OF THE ACCUMULATION OF THE *"NICOTIANA-VIRUS* 1 *(MAYER) ALLARD"* IN TOBACCO LEAVES.

Abstract

1) According to the experiments, referred to in this paper, we wish to contribute to a better understanding of the question, whether or not the virus-concentration of the inoculum exerts any

influence upon the manner in which the virus increases in the leaves and upon the severity of the symptoms exhibited by the plant.

2) This study comprises the results of inoculation experiments performed with detached leaves as well as with whole plants.

3) The experiments with detached leaves of tobacco plants were conducted after the method described by RISCHKOV *(9, 1943). In these tests the petiole was steeped in a small Petri-dish containing water or a nutrient solution, whereas the leaf-tip was supported in its position by means of a cardboard holder (plate 9, fig. A and B).*

4) At a given time the opposite halves of the blade of the tobacco leaves were rubbed with different dilutions of the juice containing tobacco-mosaic-virus. The half "A" of the blade was always inoculated with the dilution 1/10 of the crude sap, whereas the half "B" was treated with the dilution 1/10.000 of the same sap.

5) The virus-activity of the saps "a" and "d" obtained at different times of observation from the halves "A" and "B" of successive samples of the leaves were tested by means of inoculation experiments in leaves of Nicotiana glutinosa. *We considered as an index of the virus-activity of a sap the average number of local lesions produced on 5 leaves of* Nicotiana glutinosa, *which were distributed according to the schedule developed by* YOUDEN *and* PURDY-BEALE *(18, 1934).*

6) In our figures 1-6, which represent the results of 5 different series of experiments, the average numbers of necroses, produced by each sap, are plotted against the number of days elapsed from the moment of the inoculation of the tobacco leaves. The curves of our diagrams therefore illustrate the changes of virus-activity, which occur in the leaf-halves "A" and "B" during the first weeks following the inoculation.

7) Our conclusions regarding the mechanism of the increase of virus-activity in inoculated leaves are based especially upon our 4th and 5th series of experiments (fig. 4-6), because they cover longer periods of observation than the former ones (fig 1-3).

8) Referring, in the first place, to the general course of the changes of virus-activity in leaves, we were able to verify an increase of this activity, starting at the second and reaching its maximum at approximately the 20th day after the inoculation of the leaves. This increase proved to be discontinuous and to proceed sucessively through alternate periods of lesser and greater activity.

9) The differences of the virus activity between our saps "a" *and* "b", — *that is to say, the saps obtained from leaf-halves inoculated with two different dilutions of a virus-containing juice, — were very noticeable in the first two weeks following the inoculation and tended to diminish afterwards (fig. 3 and 5). But even at the end of our period of observation, these differences did not disappear entirely. This is the case at least in tests made with varieties of tobacco susceptible to the mosaic-virus. The permanent effect, which the concentration of the inoculum exercises upon the virus-activity of the inoculated leaves, is considered by us one of the most interesting results of this study.*

10) In the experimental series performed with the tobacco-variety "Palmira 12", *which is supposed to be to a certain extent resistant to the mosaic-virus, the periods of high virus-activity were characterized by absolute values, which were not very considerable. It is not surprising, therefore, that in this series the virus ativity of sap* "b", *at the end of our observations exceeded that of sap* "a".

11) Neither the general mechanism of virus accumulation in the leaves nor the relation of the rates of this increase between the halves "A" and "B" of the inoculated leaves, appeared in our experiments to be influenced, in any special way, by the mode of nutrition of the leaves or by variations of the temperature occurring during the time of our observations.

12) In the second part of the present study some preliminary notes are made on the relation between the concentration of the inoculum and the resulting severity of the symptoms on the inoculated plants. We verified, at least within the limits of our experimental conditions, that tobacco plants inoculated with high dilutions of the mosaic-containing juice frequently displayed slighter symptoms of the mosaic-disease than similar plants treated with a higher concentration of the inoculum. Fig. D of plate 10 shows progressive degrees of the intensity of symptoms in tobacco-plants, inoculated 6 weeks before with decreasing dilutions of mosaic-containing juice. On the other hand, Fig. E of the same plate illustrates the great similarity of the symptoms between plants, which had been inoculated with the same dilution of the virus-containing sap. The 5 plants of the upper row of this fig. E had been inoculated with a dilution 1/1.000.000 of the virus-containing sap, whereas the plants of the lower row had been treated with a dilution 1/10 of the same inoculum. These observations,

as well as some recent references on the subject (f.i. KAUSCHE, *4, 1937) substantiate the theory, that the concentration of the inoculum has a greater influence upon the severity of the symptoms than has hitherto been admitted.*

13) In our discussion on this subject we endeavor to explain our results from the point of view of the theory of the autocatalytic multiplication of virus in infected plants.

BIBLIOGRAFIA

1 — BAWDEN, F. C. 1939 — *Plant viruses and virus diseases.* Leiden, Holland, Chronica Botanica Company, 272 p.

2 — DOERR, R. — 1938 — Die Entwicklung der Virusforschung und ihre Problematik. *Handbuch der Virusforschung*, herausgegeben von R. Doerr u. C. Hallauer. Wien 1938, I. Hälfte: 1-125.

3 — HOLMES, F. O. — Local lesions in tobacco mosaic. *Bot. Gaz.*, 87: 39-55.

4 — KAUSCHE, G. A. — 1937 — Über einige Beziehungen zwischen Viruskonzentration und Infektionseffekt bei Viren aus der X=Gruppe der Kartoffelmosaikviren. *Biologisches Zentralblatt*, 57: 402-31.

5 — MARTIN, L. F., A. K. BALLS, H. H. MCKINNEY — 1939 — Protein changes in mosaic diseased tobacco. *The Journal of Biol. Chemistry*, 130: 687-701.

6 — MCKINNEY, H. H. — 1927 — Quantitative and purification methods in virus studies. *Journ. Agric. Res.*, 35: 13-38.

7 — MCKINNEY, H. H. and E. E. CLAYTON — 1944 — Acute and chronic symptoms in the tobacco ring-spot disease. *Phytopath.*, 34: 60-76.

8 — PATERSON, D. D. — 1938 — *Experimentatión y Aplicación Estadística para el Agronomo;* traduccion del Ingeniero Agrónomo José Calzada B., Ministerio de Fomento, Lima, Perú, 73 p.

9 — RISCHKOV, V. L. — 1943 — The nature of ultra-viruses and their biological activity. *Phytopath.*, 33: 950-955.

10 — ROSS, A. F. — 1941 — The concentration of alfalfa-mosaic virus in tobacco plants at different periods of time after inoculation. *Phytopath.*, 31: 410-420.

11 — SPENCER, E. L. — 1941 — Correlation of activity per unit weight of tobacco-mosaic virus with age of lesion, *Science*, 94: 96.

12 — SPENCER, E. L. and W. C. PRICE — 1943a — Accuracy of the local-lesion method for measuring virus activity. I. Tobacco mosaic virus. *American Journal of Botany*, 30: 280-290.

13 — SPENCER, E. L. and W. C. PRICE — 1943b — Accuracy of the local-lesion method for measuring virus activity. II. Tobacco-necrosis, alfalfa-mosaic, and tobacco-ringspot viruses. *American Journal of Botany*, 30: 340-346.

14 — STANLEY, W. M. — 1935 — Isolation of a crystalline protein possessing the properties of tobacco-mosaic virus. *Science*, 81: 644-645.

15 — STANLEY, W. S. — 1936 — Chemical studies on the virus of tobacco mosaic. VI. The isolation from diseased turkish tobacco plants of a crystalline protein possessing the properties of tobacco-mosaic-virus. *Phytopath.*, 26: 305-320.

16 — STANLEY, W. M. — 1937 — Chemical studies on the virus of tobacco mosaic. X. The activity and yield of virus protein from plants diseased for different periods of time. *Journal of Biol. Chemistry*, 121: 205-224.

17 — STANLEY, W. M. — 1939 — The architecture of viruses. *Physiological Reviews*, 19: 524-556.

18 — YOUDEN, W. J. and H. P. BEALE — 1934 — A statistical study of the local lesion method for estimating tobacco mosaic virus. *Contrib. of the Boyce Thompson Institute*, 6: 437-454.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Estampa 9

Fig. *A* — Dispositivo para a manutenção e alimentação de fôlhas isoladas de fumo utilizadas nos nossos ensaios (Fot. B. Mazza, 31/5/1944).

Fig. *B* — Uma série de fôlhas de fumo mantidas turgescentes por meio do dispositivo ilustrado na figura *A*, série esta reunida num compartimento da estufa e pronta para ser inoculada. Por meio de um termógrafo e um higrómetro acompanham-se as flutuações das condições externas (Fot. B. Mazza, 31/5/1944).

Estampa 10

Fig. *C* — 4 plantas de *Nicotiana tabacum* var. *Palmira 12*, inoculadas em 25/4/1944 respectivametne com as diluições 1/10, 1/10000, 1/100000 e 1/1000000 de um suco contendo virus do mosáico do fumo. Devido à resistência relativamente grande desta variedade ao mosáico do fumo, não se notam grandes diferenças quanto á severidade dos sintomas exibidos por estas 4 plantas (Fot. B. Mazza, 30/5/1944).

Fig. *D* — 4 plantas de *Nicotiana tabacum*, var. *White Burley* inoculadas em 8/3/1944 respectivamente (da esquerda para a direita) com as diluições 1/10, 1/10000, 1/100000 e 1/1000000 de um suco contendo virus do mosáico do fumo. Nesta variedade, que é bostante suscetível ao mosáico do fumo, verifica-se uma nítida relação entre a concentração do inóculo e a severidade dos sintomas (Fot. B. Mazza, 24/4/1944).

Fig. *E*.— Plantas de *Nicotiana tabacum*, var. *White Burley*, inoculadas em 8/3/1944 respectivamente com as diluições 1/1000000 (5 plantas da fileira superior) e 1/10 (5 plantas da fileira inferior) de um suco contendo virus do mosáico do fumo. As plantas inoculadas com a mesma diluição de virus apresentam sintomas bastante semelhantes entre si, os quais contrastam nitidamente com os exibidos pelas plantas do grupo que foi tratado com a outra diluição do virus (Fot. B. Mazza, 24/4/1944).

A

B

C

D

E

Vol. 15 — Art. 11 Dezembro de 1944

A "ESCALDADURA DAS FÔLHAS", DOENÇA DA CANA DE AÇUCAR, NOVA NO BRASIL

POR

S. C. Arruda

Do Instituto Biológico de S. Paulo

Com as estampas 11-15

Contém:

INTRODUÇÃO 141
A DOENÇA 143
I — Nomes 143
II — Histórico e distribuição geográfica 143
1) No exterior 143
2) No Brasil 145
III — Importância econômica . . . 148
1) No exterior 148
2) No Brasil 150
3) Discussão 152
IV — Sintomatologia 154
1) Sintomas morfológicos . . 154
a) forma crônica 154
b) forma aguda 156
2) Sintomas histológicos . . . 156
ETIOLOGIA 158
I — O patógeno 158
II — Isolamento 158
III — Caractéres do patógeno . . . 160
IV — Patogenicidade 161
1) Considerações gerais . . . 161
2) Métodos de inoculação . . 162
3) Inoculação 162
a) Materiais e métodos . . 162
b) Resultados e discussão . 163
DISSEMINAÇÃO 165
I — Considerações gerais 165
1) Disseminação pela propagação de mudas doentes . . 166
a) Experiência de transmissão pelo uso de mudas doentes 166
b) Experiência de transmissão mecânica com suco proveniente de uma planta doente 168
2) Disseminação pelo facão . . 169
3) Outros possíveis meios de disseminação 171
a) Pela infecção secundária . 171
b) Infecção pelo contato das raízes 172
EPIFITOLOGIA 172
CONTROLE 174
I — Cultivo de variedades resistentes 174
1) Experiência do comportamento de 13 variedades de cana, em relação à "escaldadura das fôlhas" 177
2) Resultados e discussão . . 179
II — Seleção de mudas e "roguing" . 182
1) Experiência de produção de mudas selecionadas pela prática do "roguing" 184
2) Resultado e discussão . . . 184
III — Tratamento das mudas pela água quente 187
1) Experiência de estufa para o tratamento de mudas pela água quente 187
2) Resultado e discussão . . . 188
3) Experiência de campo para o tratamento de mudas pela água quente 189
4) Resultados e discussão . . 190
RESUMO 191
ABSTRACT 192

INTRODUÇÃO

Desde Março de 1943 vimos estudando uma doença da cana de açucar, nova para nós, que ocorre em todas as grandes lavouras canavieiras do Estado de São Paulo que temos tido oportunidade de visitar.

Como se tratava de uma doença desconhecida, sempre que a ela nos referíamos usávamos o nome de "albinismo da cana", por ser

a clorose das fôlhas novas um dos sintomas mais típicos apresentados pelas plantas afetadas. O estudo minucioso das plantas doentes, seguindo a evolução de todo o quadro sintomatológico, levou-nos a associar à doença outras anormalidades que com freqüencia observávamos em algumas variedades. Êstes novos conhecimentos, de par com o estudo da literatura estrangeira sôbre o assunto, possibilitaram-nos comparar o "albinismo" com outras doenças até então consideradas não existentes no Brasil. Verificamos logo a semelhança dessa doença com a "escaldadura das fôlhas", *("leaf-scald")*, que é uma bacteriose vascular da cana de açucar, muito semelhante à "gomose", e cuja distribuição se considerava como restrita às regiões canavieiras do hemisfério oriental.

Daí por diante, encaminhámos as nossas pesquisas no sentido de se obterem dados sôbre a etiologia da nova doença, e assim tornar possível a comparação do "albinismo das fôlhas" com a "escaldadura", não somente em relação ao aspecto das plantas afetadas, mas também levando em conta a natureza do agente causal.

Os resultados das pesquisas realizadas revelaram ser a nova doença dos nossos canaviais a própria "escaldadura das fôlhas", que assim extende sua área de distribuição a um país do continente ocidental.

Nosso objetivo ao escrever êste trabalho é apresentar os resultados das pesquisas feitas para a identificação da nova doença e relatar as observações realizadas quanto ao comportamento da "escaldadura das fôlhas", nas condições mesológicas muito especiais do seu novo "habitat".

Com o intuito de ressaltar a importância do problema criado pela presença desta doença nos nossos canaviais, e de facilitar aos interessados o conhecimento dos principais resultados obtidos pelos pesquisadores que mais se dedicaram ao estudo da "escaldadura das fôlhas", os quais só são encontrados em trabalhos de dificil aquisição, presentemente, procuramos fazer aqui um apanhado da literatura, mais extenso do que seria necessario para a simples apresentação e discusão dos nossos resultados.

O autor agradece ao Snr. A. A. Bitancourt, pele revisão do manuscrito, ao Snr. Heli Camargo Mendes, pelo auxílio prestado na realização de trabalhos experimentais e na preparação do manuscrito e a todos aqueles que, de qualquer forma, tenham dado sua colaboração.

A DOENÇA

I — Nomes

Na literatura a doença tem sido referida principalmente sob os nomes de *"Gomziekte"* ou *"Java gum disease"*, devido às conclusões errôneas a que chegaram os primeiros investigadores que dela se ocuparam, nas Indias Orientais Holandezas, considerando-a idêntica à verdadeira "gomose", e, *"Leaf-scald"*. Êste último nome, que é muito expressivo porque representa um aspecto muito característico da doença, foi primeiramente usado por M. S. Barnett, na Austrália, North, (26), e hoje é universalmente adotado, na sua forma original, ou traduzido.

Na Austrália, diz ainda North, a doença fôra anteriormente referida sob os seguintes nomes: *"Mahona disease"*, *"New disease"*, *"Withering disease"*, *"Dry rot"*, *"Tip wither"*, *"Whiteleaf"*, etc. Em Formosa, Martin, Carpenter *and* Weller (25), foi denominada, em lingua japonêsa, *"Haku Jyo Byo"*, significando doença das estrias brancas. No Brasil, como dissemos, foi primeiramente chamada "Albinismo da cana". Não recebeu muitos outros nomes, provavelmente porque a sua presença nos nossos canaviais passou despercebida ao lavrador, durante anos. Entre os operários de campo, que tiveram a atenção despertada pelo aspecto esquisito das plantas afetadas, ouve-se, por vezes, chamarem-na de "Doença das fôlhas brancas", correspondendo ao nome inglês *"Whiteleaf disease"*, acima referido.

II — Histórico e distribuição geográfica

1) No exterior

Os primeiros estudos da "escaldadura das fôlhas" foram feitos em Java, por Groenewege (17), que a considerou idêntica à verdadeira "gomose" e porisso a chamou *"Gomziekte"*. Êle isolou das plantas doentes uma bacteria, que determinou como sendo o mesmo *Bacterium vascularum* Cobb., descrito na Austrália como o agente causal da "gomose". As conclusões de Groenewege foram mais tarde refutadas por Wilbrink (36), que provou ser a doença estudada por aquele pesquisador, diferente da verdadeira "gomose", não somente quanto aos sintomas, mas também em relação aos caracteres morfológicos e culturais do patógeno. Demonstrou também não ser a bacteria isolada por Groenewege nem o *Bacterium vascularum*, nem o agente causal da "escaldadura das fôlhas", ao qual se refere como *Bacterium* sp.

Wilbrink (36) realizou profundas investigações morfológicas e culturais do agente da "escaldadura das fôlhas", idealizando um meio

artificial de cultura, até hoje reconhecido o mais adequado para o isolamento da bacteria. Além disso, contribuiu com dados acerca do comportamento da doença no campo, demonstrando a importância do facão na disseminação dela. Os resultados dos seus estudos foram plenamente confirmados por NORTH (26), que na Austrália investigava a mesma questão, em completo desconhecimento dos trabalhos da cientista de Java. Dadas as condições em que foram realizados, os trabalhos de WILBRINK e de NORTH, que constituem as duas contribuições mais notáveis para o conhecimento da doença, se completam: o primeiro trata principalmente do patógeno e seu comportamento em meios artificiais de cultura; o segundo é especialmente importante no que se refere ao comportamento da doença no campo, aos meios de disseminação e às medidas de contrôle.

Fazendo o histórico da doença, em Java, WILBRINK diz que ela já era conhecida nêsse país em data anterior a 1913, atacando a variedade *"Honderdbruin"* (Parda 100). Na Austrália, segundo NORTH (26), a "escaldadura das fôlhas" já era conhecida desde 1911. Cita observações antigas, do comportamento da variedade *Mahona,* em abono da hipótese por êle formulada de que a doença, nos canaviais australianos, proviera de Nova Guiné ou de Java, em fins do século passado.

Nas Filipinas as primeiras referências à presença da doença são devidas a LEE (18), que a descreve sob o nome de *"Red vascular disease"*. Comparando os sintomas observados, com os do "serê", e baseando-se em outros sintomas que não se observam nos casos desta última doença, crê tratar-se de doença diversa. Mais tarde, voltando de uma viagem a Java, LEE (19) opina pela identidade da nova doença das Filipinas com a "gomose" de Java.

Foi somente em 1924 que NORTH e LEE (29), depois de examinar um material da doença de Java, conservado em formalina, afirmaram tratar-se de uma só doença, opinando também pelo abandono do uso do nome "gomose de Java", que além de improprio, prestava-se a confusões.

Em Formosa, segundo MARTIN e seus colaboradores (25), a doença existe desde 1918.

Em Mauritius a presença da "escaldadura das fôlhas" foi constatada por TEMPANY (34), em 1928. Segundo a opinião dêste autor, a doença existia nessa ilha havia muitos anos, mas fôra sempre confundida com a "gomose".

BAISSAC (4), num apanhado acerca das doenças da cana de açucar em Nossi Bé, Madagascar, refere-se à "escaldadura das fô-

lhas", que considera como uma das causas determinantes do deperecimento, de algumas variedades antigas nessa ilha, como a *Louizier*, e que foram abandonadas.

2) No Brasil

No Brasil a doença, embora de natureza desconhecida, vinha preocupando os técnicos de cana de açucar desde há varios anos, no Estado de São Paulo. Em 1937, a pedido do seu então Diretor, Snr. J. M. Aguirre Jr., o Autor foi à Estação Experimental de Cana de Açucar, de Piracicaba, afim-de examinar plantas doentes naquela região. Nessa ocasião observámos a clorose intensa das fôlhas das canas afetadas, bem como o seu reduzido porte. Fomos então informados de que canas com êsse aspecto vinham sendo observadas naquela Estação havia anos, mas que nos últimos tempos se tornaram muito mais numerosas, especialmente nas variedades Co. 281, P. O. J. 213 e Tuc. 419.

O primeiro exame de material doente foi por nós feito nessa ocasião, usando os recursos da microscopia e dos métodos de rotina de laboratório para o isolamento dos patógenos das plantas, em cultura pura, isto é, empregando o meio clássico de batata-dextrose-agar. Não foi então possivel verificar a presença de qualquer organismo nos tecidos, quer pela observação direta ao microscópio, quer pela plantação de material doente em meio de cultura. Hoje sabemos que o resultado negativo dêsse exame foi devido a estar o material escolhido numa fase imprópria para a pesquisa do patógeno ao microscópio, e ser o meio de cultura empregado, completamente inadequado.

Nessa ocasião a doença não foi investigada mais profundamente, porque outros problemas fitopatológicos constituiam a nossa principal ocupação e não podíamos, portanto, dedicar ao esclarecimento dessa questão o tempo necessário. Somente em 1943, de volta de uma viagem de especialização em doenças da cana de açucar, no exterior, é que retomámos a questão do estudo desta doença como um dos nossos principais planos de trabalho.

Um dos primeiros resultados dêste estudo foi o estabelecimento da identidade da doença com a "escaldadura das fôlhas" (2). Numa pesquiza para a verificação da extensão da sua distribuição, conseguimos encontra-la nas seguintes localidades: E. E. C. Açucar, Usina Monte Alegre, e Engenho Central, em P i r a c i c a b a; Fazenda Experimental Mato Dentro e Usina Esther, em C a m p i n a s; Usina Junqueira, em I g a r a p a v a; Usina Varjão, em E s p r a i a d o; e Usina Tamoio, em A r a r a q u a r a.

Fóra do Estado, sabemos da sua existência na Estação Experimental de Cana de Açucar, de C a m p o s, no Estado do Rio, de onde recebemos material para exame, do qual conseguimos isolar o patógeno em cultura pura em 30-10-1943.

A distribuição generalizada da "escaldadura das fôlhas" em todas as grandes lavouras canavieiras do Estado constitue uma indicação de que a sua introdução muito provavelmente se deu na Estação Experimental de Piracicaba, onde a maioria das usinas freqüentemente adquire mudas para o plantio. Aliás, desde o início, esta Estação nos pareceu o lugar originário da doença no Estado, porque foi para alí que se importaram as únicas variedades de cana vindas diretamente do Oriente, isto é, dos únicos países em que a "escaldadura das fôlhas" existe.

Como uma das principais razões da fundação da Estação Experimental consistia na importação e estudo de canas estrangeiras, para a renovação dos nossos canaviais, que se achavam em acentuado estado de deperecimento, era necessário que se importasse o maior número possível de variedades, para, dentre elas, selecionar as que devessem contribuir para a restauração da nossa lavoura canavieira. Muito embora todas as precauções descritas por VIZIOLI (35) tivessem sido observadas, não se conseguiu evitar a introdução desta nova doença; e a sua presença aqui parece ter passado despercebida durante alguns anos mais. Êste fato é facilmente compreensivel a todos quantos hoje estejam familiarizados com o seu comportamento em certas variedades, nas quais se apresenta numa forma latente, em que, embora doentes, as canas têm toda a aparência de sadias.

Os levantamentos que realizámos em diversas localidades afimde se saber do estado de sanidade das nossas variedades comerciais em relação à "escaldadura das fôlhas", revelaram ser a Co. 281 uma das que apresentam maior porcentagem de infecção no campo, (quanto aos lugares onde êsses dados foram obtidos). Êsse comportamento da Co. 281 despertou-nos a idéia de que ela tivesse sido introduzida já doente, ou tivesse contraído a doença durante a fase preliminar de multiplicação, que é quando, no interêsse de obter o maior número de mudas dentro do menor tempo possível, se tem a tendência de praticar uma seleção muito menos rigorosa do que a habitual, mormente no caso de uma variedade tão promissora como era esta cana da India. E como a "escaldadura das fôlhas" é transmissível pelas mudas, e de natureza incurável, é claro que, partindo-se de mudas originalmente doentes, ou das quais uma elevada porcentagem estivesse infectada, se obteriam finalmente canaviais com um alto gráu de infecção, como se observa presentemente nas lavouras desta variedade.

Pelo exame de uma relação de todas as importações realizadas pela Estação Experimental de Piracicaba entre os anos de 1926 e 1930 e que nos foi gentilmente cedida pelo Snr. A. C. MEYER, Chefe da Secção de Cana de Açucar e Plantas Oleaginosas, da Divisão de Fomento Agrícola, do Departamento da Produção Vegetal, e usando dados da mesma natureza obtidos na Secção de Vigilância Sanitária Vegetal, do Ministério da Agricultura, em Santos, verificámos que todas as importações desta variedade, de que temos conhecimento no Estado de S. Paulo, foram feitas diretamente da India, onde a "escaldadura das fôlhas" ainda não foi encontrada. Essas importações foram feitas em 1925 pelo Engenho Central de P ô r t o F e l i z, em 1930 pela Estação Experimental de Cana de P i r a c i c a b a. De todas as outras importações, apenas quatro se fizeram de países onde há a doença: duas do Japão, (Formosa), a primeira em 1926 e a segunda em 1929; uma de Java, em 1929 e, no mesmo ano, uma da Australia. Destas importações, é muito pouco provável que as três primeiras tenham trazido a doença, porque as variedades então introduzidas ainda existem no Estado, e estão, ou livres da "escaldadura das fôlhas", ou apresentando um baixo gráu de infecção, no campo. Na importação da Austrália foram introduzidas quatro variedades que já não existem no Estado, e são: N. G. - 24A, H. Q. - 426, Badila e Q. - 813. Destas variedades, duas são bem conhecidas na literatura, quanto ao comportamento em relação à "escaldadura das fôlhas": a N. G. - 24A é moderadamente resistente, e a Badila suscetível, mas tolerante, NORTH (27). E' particularmente interessante o comportamento da cana Badila, que poderia ser chamada a "cana disseminadora da e s c a l d a d u r a das f ô l h a s", devido ao fato de geralmente apresentar a doença na forma latente. Acerca do perigo representado pela introdução desta variedade em zonas livres da doença, é bastante significativa a opinião do NORTH (28), que considera a distribuição da doença nas diferentes regiões da Austrália, condicionada ao cultivo da variedade Badila, que aparentemente se comporta como uma portadora tolerante, da "escaldadura das fôlhas".

Pelas razões expostas, acreditamos que a "escaldadura das fôlhas" tenha sido introduzida no Estado no periodo decorrente entre os anos de 1925 e 1930 e, muito provavelmente, em 1929, com as canas da Austrália.

A alta porcentagem de plantas infetadas nos canaviais da Co. 281 é interpretada como uma indicação de que esta variedade contraiu

a doença durante a fase de multiplicação intensiva para a produção de mudas, operação que talvez tenha sido iniciada nas proximidades de canas portadoras da doença.

III — Importância econômica

1) No exterior

Quanto à significação econômica da "escaldadura das fôlhas" nos vários países onde existe, ou em diferentes regiões de um mesmo país, ou ainda, em várias épocas, encontramos na literatura as mais diversas opiniões, e, às vezes, aparentemente contraditórias.

A doença prejudica a cana de açucar de várias maneiras, de acordo com as condições mesológicas e as variedades cultivadas em cada lugar. De um modo geral, podemos dizer que as perdas são das seguintes naturezas:

1) — Redução da produção em toneladas de cana por unidade de superfície, motivada pelo aparecimento da doença numa forma aguda, causando a morte e destruição das touceiras atacadas, muito antes da época do corte.

2) — Enfezamento e murcha, com parcial apodrecimento, dos colmos afetados por uma forma benigna da doença, o que diminue sensivelmente o rendimento de sacarose.

3) — Grande redução na porcentagem de germinação dos toletes provenientes de canas doentes.

4) — Deperecimento das socas de variedades que normalmente dão boa produção no segundo e terceiro cortes, o que aumenta o custo da produção do açucar.

5) — Degenerecência e conseqüente necessidade de substituição de variedades de valor incontestável para certas regiões.

6) — Entrave em qualquer programa de melhoramento e criação de variedades novas de cana, por impossibilitar o emprêgo de tipos bons, mas transmissores do carater de suscetibilidade, e que se não fôra isso, seriam usados.

Os dados mais expressivos encontrados na literatura, quanto ao vulto das perdas, exclusivamente em tonelagem, são os apresentados por North (26), que fez o levantamento dos prejuizos causados aos canaviais da variedade "Mahona", no distrito de Richmond River, na Austrália, durante quatro anos consecutivos (1920-1923), numa área correspondente a 752 acres (304 Hs.). O autor chega às seguintes conclusões: em 31 acres (12,5 Hs.), perda total; em 378 acres (153 Hr.), redução superior a 25%; nos 343 acres restantes (138 Hs.), prejuízos de 10-25%. Essas cifras, na opinião do autor australiano, ainda não exprimem a realidade, porquanto não foram compu-

tadas as perdas em relação ao rendimento em açúcar, naturalmente muito comprometido pelas canas afetadas por uma forma benigna da doença, que são de muito baixa riqueza sacarina. Uma perda, talvez maior que tôdas essas referidas, foi a decorrente da necessidade da substituição da variedade "Mahona", de inestimável valor para a região, pela cana "Malabar", que, não obstante ser resistente à doença, era muito inferior à primeira.

NORTH e LEE (29), referindo-se à distribuição geográfica e importância econômica da "escaldadura das fôlhas", expressam a seguinte opinião: *"Leaf-scald has been recorded to the present time only in: Australia, Fiji, Java and the Philippines. We regard it as one of the most dextructive of the diseases of sugar cane, and sugarcane countries of the Western hemisphere should exert every possible effort to prevent its introduction".*

BELL (5), que trabalha na maior região canavieira da Austrália, (Queensland), depois de percorrer vários países onde se cultiva a cana, apresentou em 1931 uma lista das doenças mais importantes desta planta, na qual se vê em primeiro lugar a "gomose" e, logo a seguir, a "escaldadura das fôlhas", enquanto o "mosaico", cuja importância é bem conhecida por todos nós, ocupa o quinto lugar.

Ainda na Austrália, em 1925, COTTRELL-DORMER (14) considera a "escaldadura das fôlhas" como a doença indubitàvelmente mais séria da cana, no distrito de Mossman, Estado de Queensland.

Atualmente a doença é pouco prejudicial em Queensland, pois BELL (13), num dos seus relatórios mais recentes sôbre o comportamento da doença naquela região, a ela se refere como de secundária importância: *"a minor disease"*. Isso se explica devido ao fato referido por BELL (10), da disseminação da "escaldadura das fôlhas" ser lenta nessa região da Austrália, porque as freqüentes sêcas causam a morte das touceiras doentes, eliminando assim os focos de infecção.

BELL (1) confirma êste comportamento da doença em Queensland, recentemente, dizendo que ela só é prejudicial em terrenos baixos e úmidos.

Segundo WILBRINCK (36), em Java freqüentemente registravam-se prejuízos apreciáveis em plantações novas, e a presença da doença impossibilitava em certas áreas o cultivo de variedades ricas em sacarose, porém suscetíveis.

Em Hawaii, na opinião de MARTIN e seus colaboradores (25), a doença não tem causado prejuízos apreciáveis, porque ocorre numa área muito limitada. Consideram-na, entretanto, como potencialmente de grande importância econômica. MARTIN (21) apresenta o resultado

(1) Carta de 29-11-1943, dirigida ao autor.

de análises comparativas do caldo de cana sã e de três tipos de canas doentes: levemente afetadas, moderadamente afetadas e severamente afetadas. Conclue que a qualidade do caldo de uma variedade está na razão inversa da intensidade do ataque, dizendo que se devem esperar grandes perdas nos canaviais severamente afetados.

Em Mauritius, segundo ORIAN (30), a "escaldadura das fôlhas" e a "gomose" são as doenças mais importantes da cana de açúcar. Os levantamentos de campo, com relação à segunda doença, revelaram uma incidência de 8,8% de plantas afetadas.

SHEPHERD (32), na mesma ilha, determinou a porcentagem de canas doentes encontradas na esteira das moendas de uma usina, observando que 9% dos colmos eram afetados pela doença. Ainda o mesmo autor (31) diz que a "escaldadura das fôlhas", nas variedades "*White Tanna*" e "*Striped Tanna*", pode causar uma redução de 5-11%, de pêso, e 16% de sacarose, nos colmos afetados.

2) No Brasil

No Estado de São Paulo, ao qual se restringem nossas observações, embora se encontrem canaviais severamente atacados, não se pode dizer que a "escaldadura das fôlhas" tenha causado prejuízos de importância comercial. A razão é que as variedades atualmente mais intensamente atacadas são canas cultivadas em pequena escala, em tôdas as usinas, umas por não serem muito apreciadas, e outras, recentemente introduzidas, por se acharem ainda em fase de intensa multiplicação. Felizmente as variedades mais largamente cultivadas são as que apresentam o mais baixo grau de incidência da doença, quer por terem escapado à infecção, quer por serem de maior resistência.

Para formar um juízo sôbre o estado atual de sanidade dos nossos canaviais, com relação a esta doença, temos feito freqüentes inspecções nas plantações de várias usinas, procurando determinar o grau de incidência da "escaldadura das fôlhas", nas nossas principais variedades comerciais e entre as canas mais promissoras que foram introduzidas ùltimamente e se acham em multiplicação.

A Tabela 1, que contém os resultados de algumas dessas inspecções, dá uma idéia do estado de sanidade das mais importantes dessas variedades e em diversas localidades.

Nessa tabela não foram incluidas duas variedades que, em algumas localidades, são cultivadas em larga escala: P.O.J. 213 e C.P. 27/139. A primeira parece suscetível, mas tem, provàvelmente, por razões que discutiremos mais adiante, escapado à infecção, apresentando um baixo grau de incidência da doença, no campo. A se-

gunda, nas condições das grandes plantações, parece uma variedade muito resistente, pois não se encontram touceiras suas com os sintomas típicos da doença, na sua forma mais prejudicial.

TABELA 1

Determinação da porcentagem de infecção pela "escaldadura das fôlhas", de diversas variedades de cana, em diversas localidades do Est. de São Paulo

Data obs.	Localidade	Variedade	Idade	N.º touceiras		% de Infecção
				Doentes	Sãs	
14 - 3 - 44	Usina Tamoio	C. P. 29/320	Cana planta	43	164	20,7
24 - 2 - 44	Usina Tamoio	C. P. 29/320	Soca 2.º corte	51	85	37,5
24 - 2 - 44	Usina Tamoio	Co. 281	Soca 3.º corte	42	205	17,0
13 - 3 - 44	Usina Tamoio	Co. 290	Cana planta	2	197	1,0
10 - 1 - 44	F. E. Mt.º Dentro	Co. 290	Cana planta	7	121	5,4
17 - 5 - 44	E. E. C. Aç. Piracicaba	C. P. 29/320	Soca 3.º corte	79	42	65,2
30 - 5 - 44	E. E. C. Aç. Piracicaba	C. P. 29/320	Cana planta	72	162	30,7
30 - 5 - 44	E. E. C. Aç. Piracicaba	Co. 290	Soca 2.º corte	10	196	4,8
25 - 1 - 44	Usina Esther	Co. 290	Soca 2.º corte	5	97	4,9
25 - 1 - 44	Usina Esther	Co. 281	Soca 2.º corte	6	110	5,1

Pelos dados da Tabela 1, vemos que as canas que se encontram em piores condições são a Co. 281 e a C.P. 29/320. A variedade Co. 290, com uma porcentagem baixa de infecção, entre 1 e 5,5%, estaria bem. Acreditamos, entretanto, que êsses dados não exprimem a realidade, devido ao fato desta variedade apresentar grande tendência para o mascaramento dos sintomas da "escaldadura das fôlhas", principalmente durante a época mais favorável à vegetação da cana. Por esta razão, muitas das touceiras, efetivamente doentes, são computadas como sãs. A maioria destas canas, que, como veremos, são capazes de transmitir a doença, somente apresentam os primeiros sinais de infecção quando atingem um estado de quase completa maturação, nos meses de junho em diante.

Para fazer uma estimativa do vulto das perdas que esta doença poderia causar, admitindo a hipótese de que aqui tenha encontrado condições favoráveis para a disseminação e que não fossem adotadas medidas de controle visando a conservação das atuais variedades, foram projetadas diversas experiências, que se instalaram em diversas localidades do Estado. Instalaram-se ainda outros ensaios de campo, cujos principais objetivos eram de outra natureza, mas que servem também para a avaliação das perdas decorrentes do emprego de canas doentes como mudas. Exceção feita de um campo, que foi instalado em março de 1943, na Fazenda Experimental Mato Dentro, todos os ensaios foram instalados em 1944, nos meses de fevereiro e março. Por

esta razão, os dados obtidos até agora referem-se aos prejuízos de uma só natureza, isto é, decréscimo do *"stand"* de germinação.

As mudas empregadas nesses ensaios foram de dois tipos: mudas doentes e mudas sãs. Para a preparação das mudas sãs foram escolhidos apenas os colmos em cujas touceiras não havia nenhuma cana que apresentasse sintomas da "escaldadura das fôlhas". Para as mudas doentes escolheram-se apenas as canas que exibissem sintomas típicos da doença, preferindo-se, todavia, as de porte normal. As canas doentes e as sãs foram colhidas e repicadas separadamente. Praticou-se a seleção habitual em cada um dos lotes dos colmos, isto é, eliminaram-se, de início, as gemas basais e apicais de cada colmo, descartando-se, também, os gomos broqueados e as partes em que as gemas estavam brotadas. Tôdas as mudas continham apenas duas gemas. As mudas foram plantadas em canteiros de 10 x 5 m, cada um contendo três linhas úteis, com um total de 60 toletes. Cada tratamento foi repetido 4 vêzes, sendo os canteiros distribuidos ao acaso ou segundo o sistema do quadrado latino. Fizeram-se duas contagens do *"stand"* de germinação, respectivamente no primeiro e segundo meses após o plantio.

3) Resultados e discussão

Os resultados das contagens do *"stand"*, bem como os dados complementares das experiências, estão condensados na Tabela 2.

TABELA 2

Comparação entre mudas doentes e sãs, de três variedades, para a determinação da influência da "escaldadura" sôbre o "stand" de germinação

Localidade	Variedade	Total mudas plantadas		Total mudas germinadas		% germinação	
		Sãs	Doentes	Sãs	Doentes	Sãs	Doentes
Usina Tamoio	C. P. 29/320	240	240	218	59	90,8	24,5
Usina Tamoio	Co. 290	240	240	212	134	88,3	56,8
Usina Esther	Co. 281	1920	1920	1851	532	85,9	27,7
F. E. M. Dentro	C. P. 29/320	88	128	74	9	84,0	7,0

Pelo que foi dito, deduz-se que a "escaldadura das fôlhas" só se encontra em elevada porcentagem numas poucas variedades, que são cultivadas em pequena escala. Estas variedades, (Co. 281 e C.P. 29/320), são, geralmente, muito prejudicadas, porque a doença causa um baixo *"stand"* de germinação, nas plantações novas, influe no crescimento das touceiras afetadas, reduzindo a produção em tonelagem e rendimento de açúcar, e provoca o deperecimento e morte das

socas. Êstes prejuízos, entretanto, passam despercebidos aos interessados, porque pouco influem na produção total das usinas, que reflete o comportamento das variedades largamente cultivadas, como a Co. 290. Aparentemente, portanto, êles nada significam. Tornam-se todavia muito importantes se considerarmos que, não se controlando a doença, essas variedades mais suscetíveis irão certamente apresentar-se com uma porcentagem de infecção muito mais elevada, num futuro muito próximo, e ficarão completamente degeneradas. Êsse perigo se torna bem mais evidente quando nos lembramos de que uma dessas variedades, (C.P. 29/320), aqui foi introduzida completamente livre da "escaldadura das fôlhas", em data mais ou menos recente, isto é, em 1940, e hoje é uma das que apresentam o grau mais elevado de incidência da doença, no campo. Se se continuar multiplicando livremente tais variedades, como até aqui se tem feito, elas virão a ser, num futuro muito próximo, canas completamente degeneradas. Terão que ser substituidas, porque, então, tôdas as suas principais virtudes terão desaparecido.

Embora as variedades em questão sejam cultivadas em pequena escala, seu abandono, em virtude da doença, representaria um sério problema para os nossos cultivadores de cana, porque elas pertencem a um pequeno grupo, do qual nenhuma usina bem organizada pode prescindir. São as variedades de maturação precoce, indispensáveis para a antecipação da safra. A Co. 281 é uma variedade bem conhecida, entre nós, como precoce, e a C.P. 29/320, cujo comportamento nas nossas condições ainda não foi suficientemente estudado, é considerada, neste particular, nos Estados Unidos, onde o caráter de precocidade representa um requisito de primordial importância para uma bôa variedade, como sendo de comportamento mais ou menos semelhante ao da cana indiana. A outra variedade dêste grupo, a P.O.J. 213, que, aliás, é a mais importante de tôdas, é classificada por WILBRINK (36) entre as variedades mais suscetíveis à "escaldadura das fôlhas". Como foi dito anteriormente, a P.O.J. 213 se encontra em muito bom estado com relação a esta doença, porque a porcentagem de plantas doentes, no campo, é muito baixa. As poucas touceiras que se encontram infectadas, geralmente apresentam a doença numa forma muito severa. E' muito provável, portanto, que sendo cultivada em presença da doença, o grau de incidência da "escaldadura das fôlhas" nesta variedade venha a aumentar nos anos seguintes.

Outro aspecto importante da questão consiste no fato de que a existência da doença nos nossos canaviais representa um sério obstáculo para a aclimação de novas variedades, originárias de países onde

não existe a "escaldadura das fôlhas". Além disso, a doença iria provàvelmente influir em qualquer programa de criação de novas variedades que se pretendesse empreender no nosso Estado, porque impossibilitaria o emprego, nos cruzamentos, de canas transmissoras do caráter de suscetibilidade.

Pelas razões expostas, somos de opinião que, embora não seja de importância comercial o vulto das perdas atualmente aqui verificadas, devidas à "escaldadura das fôlhas", esta doença deve ser considerada como potencialmente de grande importância econômica, justificando, desde já, a adoção de medidas que visem o seu controle.

IV — Sintomatologia

1) Sintomas morfológicos

Wilbrink (36) e North (26), bem como outros autores, reconhecem que a "escaldadura das fôlhas" se manifesta sob duas diferentes formas, no campo: a forma crônica e a forma aguda.

Como ambas as formas são encontradas nas nossas condições, para conveniência de exposição descreveremos separadamente cada uma delas.

a) Forma crônica — O que é mais notável numa planta afetada pela doença sob esta forma, é o aspecto das fôlhas, principalmente na fase inicial do desenvolvimento dos sintomas. Aparecem primeiramente umas estrias muito estreitas e compridas, medindo 1-2 mm de largura, localizadas no limbo ou na nervura principal, estendendo-se da ponta ou de um dos bordos à base da fôlha e prolongando-se, geralmente, pela bainha abaixo (Estampa 11, fig. *A*). Estas estrias são de bordos muito definidos, lembrando um risco direito, feito sôbre a fôlha com um lápis branco. Há entretanto estrias de bordos indefinidos e que também não se estendem pela bainha, tornando-se, então, perfeitamente confundíveis com as estrias provocadas pela "chlorotic streak", que ainda não foi encontrada no Brasil. As estrias seguem o curso dos feixes fibrovasculares invadidos pelo patógeno, até a sua extremidade, e porisso terminam na ponta da fôlha, no caso de uma estria localizada na nervura principal, ou muito próximo dela; ou terminam nos bordos, tanto mais distante da extremidade quanto mais afastada esteja, na sua base, da nervura principal. De início, essas estrias são uniformemente cloróticas ou esbranquiçadas, raramente vermelhas ou manchadas desta côr; mais tarde, alargam-se, e os tecidos tornam-se necróticos e de coloração amarelada, progressivamente, da extremidade para a base. Por esta razão, as fôlhas portadoras de estrias ficam completamente sêcas, com o tempo.

Vem dêsse aspecto característico o nome "escaldadura das fôlhas", que a doença recebeu na Austrália. A esta fase das estrias segue-se a do albinismo do tôpo, na qual as fôlhas novas, terminais, nascem completa ou parcialmente cloróticas. Uma planta que atinge êste estado da doença, murcha e seca em pouco tempo. Os colmos doentes, quando plantados, dão origem a brotos que se comportam de modo diferente, segundo o grau de resistência da variedade. Podem ser, no início, aparentemente normais, com ou sem estrias nas fôlhas, ou apresentar um acentuado enfezamento desde a emergência do solo, tendo as fôlhas parcial ou totalmente albinas (Estampa 12, fig. *C*). Em tal caso, emergem, freqüentemente, já completamente deformados (Estampa 12, fig. *D*).

Nos colmos afetados, o que se nota externamente é a brotação prematura das gemas laterais, (Estampa 14, fig. *F*). Os brotos que se formam apresentam, no geral, as estrias descritas. Os colmos afetados têm, na maioria dos casos, internódios muito curtos, e apresentam, porisso, acentuado enfezamento. Há casos, porém, de canas doentes, portadoras de leves estrias das fôlhas, que têm o aspecto de normais (Estampa 11, fig. *B-b*). As canas intensamente afetadas, que são as enfezadas, portadoras de fôlhas brancas, (Estampa 11, fig. *B-a*), murcham e secam logo na entrada da estação sêca, de março em diante.

Abrindo-se ao meio um colmo doente, para um exame interno, o que se nota é certa descoloração dos feixes fibrovasculares, que é sempre mais pronunciada na região dos nós, variando de intensidade com a variedade examinada e o estado de desenvolvimento da doença, (Estampa 13, fig. *E*). Na variedade Co. 290, por exemplo, é muito difícil encontrarem-se feixes fibrovasculares descoloridos, num colmo cujas fôlhas apresentem apenas as estrias e cujo crescimento seja aparentemente normal. Os feixes fibrovasculares avermelhados só são encontrados nos colmos muito enfezados, cujas fôlhas do tôpo estejam albinas. Na variedade C.P. 29/320, que é muito mais suscetível, a descoloração dos feixes fibrovasculares é quase sempre observada, numa maior ou menor intensidade, de acôrdo com o estado de desenvolvimento dos sintomas das fôlhas. Nos colmos doentes, mas de crescimento aparentemente normal, as estrias são escassas e localizadas, com freqüência, na região dos nós. Nos colmos que estejam num estado de acentuado enfezamento, a descoloração dos feixes fibrovasculares é abundante e de distribuição generalizada, isto é, encontra-se nos nós e internódios.

Ainda nesta variedade, é freqüente a formação de cavidades, muito longas, mas de diâmetro pequeno, sempre localizadas ao longo de feixes fibrovasculares descoloridos (Estampa 13, fig. *E*).

Um fato comum a esta doença e que a torna, às vêzes, de difícil diagnóstico, é a tendência de certas canas doentes a apresentar um estado de aparente restabelecimento, ou latência, principalmente durante o período do ano mais favorável à vegetação da cana. Os sintomas das fôlhas chegam a desaparecer completamente, durante um período variável, determinado pelas condições ambiente.

b) Forma aguda — Esta forma é muito menos comum do que a anterior, e aparece, geralmente, quando a um período prolongado de chuvas sobrevem uma sêca, isto é, de meados de março em diante.

Caracteriza-se pelo murchamento rápido e total das fôlhas das canas afetadas. Ocorre, freqüentemente, nas canas em que a doença tenha ficado no estado de latência durante os meses chuvosos.

2) Sintomas Histológicos

Fazendo-se secções transversais em uma fôlha, de modo a apanhar toda a estria e parte dos tecidos clorofilados visinhos, observa-se que a estria abrange sempre um feixe fibrovascular do tipo grande, que ocupa uma posição central e, no mínimo, os dois feixes pequenos mais próximos; quase sempre compreende, também, um ou mais feixes do tipo médio. Êsses feixes fibrovasculares ficam completamente desprovidos dos cloroplastes, tanto nas células componentes de sua bainha clorofiliana como nas do parênquima adjacente, devido à completa degenerescência e desintegração dêsses elementos. Quando a estria se torna mais velha e se alarga, a degenerescência e desintegração dos cloroplastes se estende, progressivamente, aos feixes visinhos.

Quanto à estrutura, os feixes fibrovasculares localizados numa estria podem ser, de início, morfològicamente idênticos aos dos tecidos normais. Com o tempo, entretanto, dá-se a formação de uma substância gomosa, a princípio de côr clara, depois amarelada ou parda, que ocupa o interior dos vasos lenhosos. As paredes dos vasos, principalmente as do metaxilema, ficam tomadas da mesma coloração do seu conteúdo gomoso. Essa formação de goma nos feixes fibrovasculares das fôlhas nem sempre é observada, principalmente nas estrias novas, que não apresentam a necrose dos tecidos nem mesmo na parte terminal. No caso de estrias muito novas, e em preparações montadas em água apenas, geralmente se observa, no lumen dos vasos, grande

quantidade de pequenos corpúsculos arredondados, dotados de movimentos rápidos, e que são as bacterias. Nas estrias mais velhas apresentando já a formação da substância gomosa no lumen dos vasos, estando esta substância incolor, pode-se fàcilmente distinguir grande número de bacterias, empregando para montagem uma solução muito diluida de azul-de-algodão, a qual colore as bacterias, tornando-as bem diferenciadas do meio em que se encontram, tanto no proto como no metaxilema.

Quando a substância gomosa se torna intensamente colorida já não é possível a diferenciação das bacterias pelo processo simples que vimos empregando. E' por essa razão que nem sempre se pode positivar a presença de bacterias em certos materiais examinados, dependendo então, o diagnóstico, exclusivamente das alterações que se verificam nos feixes fibrovasculares.

No caso do protoxilema, as bacterias parecem ter certa ação dissolvente sôbre as paredes primárias dos vasos anulares e espiralados, cujos elementos de sustentação ficam livres numa cavidade que é formada pela lacuna do protoxilema mais o espaço inicialmente ocupado pelos vasos. Essa cavidade geralmente fica cheia da mesma goma. A destruição lisígena das células parenquimatosas visinhas do protoxilema e a ruptura das paredes primárias dos vasos, sujeitos a constante distensão, ocorrem como um processo natural da evolução dêsses elementos, mas, nos vasos afetados, o patógeno parece agir provocando a aceleração do desenvolvimento dêsse processo.

O floema, que geralmente permanece inalterável, é às vêzes afetado, havendo completa degenerescência e desintegração dos tubos crivados e células-companheiras, e conseqüente formação de outra cavidade, delimitada pelos elementos inalteráveis da bainha esclerenquimatosa dos feixes fibrovasculares (Estampa 14, fig. *H*). Esta cavidade, em geral se mostra invadida pela mesma substância gomosa, no meio da qual temos, com freqüência, conseguido divisar grande número de bacterias, como ilustra NORTH (26); todavia, como nossas observações se basearam em secções feitas à mão livre, admitimos que tais bacterias possam ter sido transportadas do xilema para o floema, na operação do corte, e que, na realidade, a desintegração dos tubos crivados e das células-companheiras não seja devida ao ataque direto das bacterias, mas resultado da ação de produtos secretados pelo patógeno, como lembram MARTIN e seus colaboradores (25).

No colmo, o patógeno se localiza no xilema, e as alterações sofridas pelos feixes fibrovasculares são mais ou menos as mesmas descritas para as fôlhas. Aqui a formação de goma no interior dos vasos

parece mais abundante e a sua coloração mais intensa do que se observa nas fôlhas (Estampa 14, fig. *G*). Nêste caso, às vêzes a ação lisígena do patógeno não se restringe exclusivamente às células do parênquima e do floema do feixe fibrovascular pròpriamente dito, mas se estende também ao parênquima adjacente da medula, com a formação de cavidades. A goma que se encontra nos vasos nem sempre é de aparência homogênea. Apresenta-se, às vêzes, cheia de granulações com o aspecto de verdadeiros corpúsculos semelhantes aos "coacervates", que lembram certas formas de fungos inferiores e mixomicetos, descritos como parasitas da cana.

ETIOLOGIA

I — O PATÓGENO

A "escaldadura das fôlhas" é causada pela bacteria *Phytomonas albilineans* ASHBY. Embora êste patógeno tivesse sido minuciosamente estudado por WILBRINK (36) e NORTH (26), e fôsse considerado distinto das outras bacterias agentes de doenças da cana de açúcar, foi referido por êstes e outros autores, durante vários anos, como *Bacterium* sp. Foi sòmente em 1929 que ASHBY (3), estudando uma cultura que lhe fôra remetida da Austrália, por NORTH conseguiu verificar que os bastonetes eram providos de um flagelo polar. Por esta razão incluiu o novo patógeno da cana de açúcar no gênero *Phytomonas*, propondo para denominá-lo o binômio *P. albilineans*. As observações de ASHBY limitaram-se à morfologia da bacteria. Em 1932, MARTIN e seus colaboradores (25), trabalhando com a "escaldadura das fôlhas" em Hawaii, estudaram também os caracteres morfológicos, fisiológicos e culturais do patógeno, confirmando plenamente os resultados de WILBRINK (36) e NORTH (26), bem como as observações de ASHBY. Aos autores de Hawaii são devidas as primeiras ilustrações que demonstram o caráter monotríquico dos bastonetes, de acôrdo com a descrição de ASHBY (3). A bacteria foi recentemente incluida por DOWSON (16) no gênero Xanthomonas, de sua autoria. Segundo êste novo sistema de classificação dos patógenos das plantas, o agente da "escaldadura das fôlhas" deverá ser chamado *Xanthomonas albilineans* (ASHBY) DOWSON.

II — ISOLAMENTO

Para o isolamento do patógeno dos tecidos doentes, tanto das estrias das fôlhas como dos colmos, temos conseguido bons resultados

adotando o meio líquido de caldo de cana e peptona, de NORTH (26,[2]), para as plantações de tecidos, e o agar de sacarose e peptona, de WILBRINK (36,[3]), para as placas de Petri destinadas à diluição e isolamento das colónias. Tratando-se das estrias, que devem ser, preferìvelmente, de fôlhas novas, o material deve ser prèviamente desinfetado numa solução de sublimado corrosivo a 1/1000, durante 1 e 3 minutos, para as lesões localizadas respectivamente no limbo ou na nervura principal. Faz-se a lavagem em água esterilizada, por 3 vêzes, para eliminar o desinfetante. Procede-se, a seguir, à repicagem dos tecidos, assèpticamente, de modo a se obter, finalmente, pedaços de estrias não maiores do que 1-2 mm, os quais são imediatamente transferidos para os tubos contendo meio líquido, na razão de um pedaço para cada tubo. Desejando-se isolar o organismo do colmo, devem-se escolher canas afetadas por uma forma benigna da doença, que não apresentem descoloração muito intensa dos feixes fibrovasculares, pois quando se escolhem fibras avermelhadas o aparecimento de organismos secundários, de crescimento rápido, é muito freqüente. Abrem-se os colmos ao meio, procurando-se tirar, assèpticamente, pequenos pedaços de tecidos contendo os feixes fibrovasculares e parênquima medular, os quais são a seguir repicados e transferidos diretamente para os tubos de cultura. Nêste caso é dispensável a desinfeção pelo sublimado corrosivo.

Temos empregado para a incubação, a temperatura de 25° C, considerada ótima para o crescimento do patógeno (25).

Após 72 horas de incubação, faz-se um exame de todos os tubos, eliminando-se os que apresentem qualquer turvação do meio, uma vez que, a êsse tempo, no caldo de cana-peptona, sòmente crescem os organismos secundários e contaminações de crescimento rápido. Conservam-se apenas os tubos que nessa ocasião estejam com o meio completamente transparente. Mantidos na temperatura de 25° C., os tubos nos quais houver crescimento da bacteria desejada, apresentarão, depois do oitavo dia a partir da data das plantações de tecidos, uma leve turvação do meio. A seguir procede-se à diluição de uma gota dêsse

(2) O meio de NORTH tem a seguinte composição:

Caldo de cana	250 cc
Água	750 cc
Peptona	0,5 gr

Sempre o temos usado com pH entre 6,9 — 7,1.

(3) O meio de WILBRINK é o seguinte:

Água distilada	1000 cc
Peptona	5 gr
Fosfato de potássio (dibásico)	0,5 gr
Sulfato de magnésio	0,25 gr
Agar	15 gr
Sacarose	10 gr

A sacarose quimicamente pura pode ser substituida pelo açucar de cana comercial, na mesma quantidade.

meio para cada placa de Petri, contendo o agar de sacarose e peptona de WILBRINK. Ao envez do processo clássico de diluição, temos empregado, com melhores resultados, o de semeadura no meio sólido com o auxílio do rodo de vidro, porque nêste caso sòmente se formam colónias superficiais, de crescimento muito mais rápido e mais facilmente isoláveis.

As colónias de *P. albilineans,* à temperatura de 25° C., aparecem, depois do 4.° dia, como pequenos pontos esbranquiçados, que 2-3 dias mais tarde, aumentando em diâmetro, assumem uma coloração amarela, côr de camurça, muito caraterística.

A transferência direta, de uma alça contendo o meio líquido que apresente leve turvação, no 8.° ou 10.° dia, para tubos inclinados de agar de sacarose e peptona de WILBRINK, é um processo simples de isolamento e que tem dádo bons resultados quando se fazem as plantações em meio de caldo de cana e peptona. O caldo de cana e peptona, nêste caso, comporta-se verdadeiramente como meio seletivo, permitindo, como nos outros meios, o crescimento rápido dos organismos secundários e contaminações, os quais são eliminados na seleção dos tubos que se pratica no 3.° dia. O agente da "escaldadura das fôlhas", que aparece no 8.° dia, geralmente se encontra como uma verdadeira cultura pura nos tubos originais, podendo portanto ser repicado diretamente para tubos de agar inclinado. O estado de pureza dessas culturas tem sido sempre comprovado nas placas de diluição.

III — CARACTERES DO PATÓGENO

A *P. albilineans* é uma bacteria que apresenta uma série de caracteres que lhe são muito peculiares e a tornam fàcilmente reconhecível às pessoas que com ela trabalhem durante algum tempo.

Em primeiro lugar se caracteriza por ser um organismo de crescimento muito lento, em todos os meios de cultura. As colônias, que são circulares, de bordos uniformes, de consistência gelatinosa, e brilhante, têm uma coloração amarela muito característica, que segundo MARTIN e seus colaboradores (25), corresponde ao "cream buff" da escala de RIDGEWAY (4), WILBRINK (36) e NORTH (26), respectivamente, classificam essa tonalidade de côr, de amarelo-mel e amarelo-camurça. Ao microscópio, as bacterias apresentam-se como bastonetes móveis, muito pequenos, curtos e estreitos, retos ou recurvados.

E' um aspecto especialmente caraterístico dêsse organismo, em cultura, o fato de apresentar, com o envelhecimento desta, grande tendência para profundas alterações morfológicas. Nas colônias novas os bastonetes encontram-se, ou isolados ou reunidos em forma de curtas

(4) Ridgeway, Robert — 1912 — "Color Standards and Nomenclature".

cadeias; mas nas culturas velhas apresentam-se formando cadeias muito longas, verdadeiros fios de bastonetes. Aliás essas alterações foram muito bem ilustradas por NORTH (26) como formas de involução do patógeno, em cultura.

Os bastonetes são Gram-negativos, porque perdem a coloração própria do cristal violeta durante a marcha do processo de coloração (5), mas não se colorem pela safranina. Temos obtido boa coloração usando a carbol-fucsina de Ziehl. Quanto aos cílios, embora os tenhamos observado destacados dos bastonetes, ainda não conseguimos verificar o caráter monotríquico dêles, sempre que tentamos colorí-los empregando o método de Zettnow, aliás usado com bons resultados para outros patógenos das plantas. As dificuldades encontradas são provàvelmente devidas ao fato de ser a bacteria da "escaldadura das fôlhas" de crescimento excessivamente lento. Quanto à cápsula, considerada "aparentemente presente" por MARTIN e seus colaboradores (25), não logramos observá-la.

A bacteria existente no Brasil, que consideramos idêntica a *P. albilineans* ASHBY, em seus caracteres morfológicos, fisiológicos e culturais, foi descrita, resumidamente, por ARRUDA e FRANCO DO AMARAL (2), do seguinte modo:

"A bacteria é um organismo em forma de bastonetes delgados, não esporulados, formando cadeias em cultura. E' móvel, embora os flagelos não tenham ainda sido coloridos pelo método de Zettnow. Em placas de agar, (depois de 5-8 dias), forma colônias pequenas a minúsculas, de superfície brilhante e bordos inteiros, de consistência viscosa e côr amarelo-camurça. Produz turvação em caldo, formando um filamento que se fixa ao fundo do tubo. Outras reações fisiológicas indicam bom crescimento em açúcar, sem fermentação; bom crescimento em água de peptona em presença de carbohidratos; não hidrolisa o amido; não produz H_2S, indol nem NH_3; não reduz os nitratos; não liquefaz gelatina; não altera o leite" (6).

Êsses caraterísticos concordam plenamente com os descritos por WILBRINK (36), a respeito do patógeno por ela estudado, e que hoje sabemos ser a verdadeira *P. albilineans*.

IV — PATOGENICIDADE

1) CONSIDERAÇÕES GERAIS

A *P. albilineans* é um parasita muito forte, com o qual, usando culturas puras, em estado ativo de crescimento, se consegue infectar a cana com relativa facilidade. O que parece indispensável, segundo

(5) Processo de Gram, modificado por Hucker (33).
(6) Tradução do original inglês.

NORTH (26), para se conseguir a reprodução dos sintomas típicos da doença por meio de inoculações artificiais, é que o parasita possa conseguir acesso aos tecidos embrionários, em estado ativo de crescimento, os quais constituem o meio mais propício à multiplicação das bacterias.

2) MÉTODOS DE INOCULAÇÃO

Vários métodos de inoculação têm sido experimentados e descritos, para diversos fins. O mais simples, com o qual temos conseguido muito bons resultados, consiste na inoculação dos toletes justamente na ocasião do plantio. A injeção de suspensões bacterianas, com o auxílio de uma agulha de injeção hipodérmica, na extremidade de colmos em ativo estado de vegetação, tem sido experimentada com sucesso por vários autores (26, 36). MARTIN (22) descreve como um dos processos mais eficientes a inoculação das soqueiras, por meio da pincelagem com uma suspensão bacteriana.

O método mais extensivamente adotado, porque se presta para as inoculações em massa, tem sido o da inoculação dos toletes, na ocasião do plantio. Para tornar mais rápido o processo, têm sido idealizados aparelhos inoculadores especiais, como os empregados por BELL (8).

3) EXPERIÊNCIAS DE INOCULAÇÃO COM DIVERSOS ISOLAMENTOS

O método de inoculação dos toletes foi o que escolhemos para provar a patogenicidade das nossas culturas bacterianas. Por esta razão, toda a marcha do processo seguido será descrita.

a) MATERIAIS E MÉTODOS

Foi escolhida a cana Co. 290, que embora seja tolerante à doença, e porisso até certo ponto inadequada a experiências desta natureza, apresentava a vantagem de ser uma variedade de baixo índice de incidência da doença, no campo, o que tornava fácil a escolha dos colmos sãos a serem usados.

Tôdas as canas foram picadas à mão, de forma a se obterem mudas de uma só gema. As mudas de cada um dos colmos usados foram numeradas, na ordem ascendente, da base para a ponta, recebendo a muda basal o número 1. Como todos os colmos foram prèviamente numerados, cada gema era representada por um símbolo composto de dois números: o primeiro, representando o colmo, e o segundo, entre parêntesis, indicando a posição da gema nesse colmo; assim, a muda acompanhada de uma etiqueta com o símbolo 3(7), podia ser fàcilmente identificada como a sétima gema, a partir do pé, do colmo número 3. Duas ou três mudas de cada colmo, a diversas alturas, isto é, próximo ao pé, ao meio e à ponta, foram sempre escolhidas

para servir como testemunhas. As cinco ou sete mudas restantes, de cada um dos colmos, eram inoculadas. Para cada isolamento a ser inoculado, empregaram-se 2 a 5 canas. Foram experimentados quatro diferentes isolamentos, todos considerados idênticos, e registrados em nosso livro de culturas sob os seguintes números: 27, 48, 49 e 55. Os dados sôbre a origem dêsses isolamentos encontram-se na Tabela 3.

TABELA 3

Origem das culturas bacterianas, isoladas de plantas com os sintomas típicos da "escaldadura das fôlhas" e empregadas em experiências de inoculação

N. da cultura	Data Isolamento	Variedade de cana	Localidade	Procedência
27	14-4-43	C. P. 29/320	Piracicaba	E. E. C. Aç.
48	5-8-43	P. O. J. 2878	Piracicaba	U. M. Alegre
49	5-8-43	C. P. 29/320	Piracicaba	E. E. C. Aç.
55	5-8-43.	Co. 281	Piracicaba	U. M. Alegre

O inóculo usado consistiu duma suspensão bacteriana em água esterilizada, para cuja preparação se empregaram culturas em agar de peptona e caldo de cana, (o meio de NORTH, adicionado de 2% de agar), com 10 dias de idade e mantidas à temperatura de 25° C. Por meio de um pequeno estilete de 3 mm de diâmetro, fazia-se um furo em cada extremidade do tolete. A seguir, empregando-se uma pipeta esterilizada, introduzia-se a suspensão bacteriana em cada um dos furos, espalhando-se depois, o inóculo sôbre ambas as extremidades da muda. As mudas testemunhas foram submetidas a tratamentos idênticos aos das inoculadas, porém em lugar da suspensão bacteriana receberam água esterilizada. A plantação das mudas inoculadas e testemunhas foi feita logo após a inoculação, em pequenos vasos de barro, de 12 cm de boca, contendo terra esterilizada. Os vasos foram imediatamente levados a uma estufa à prova de insetos, onde permaneceram embutidos em serragem de madeira, para manter no solo um grau de umidade mais favorável e constante.

b) Resultados e discussão

Seguindo o método descrito, realizamos diversas experiências de inoculação, cujos resultados, por conveniência de exposição, serão apresentados e discutidos conjuntamente.

Tôdas as culturas inoculadas se mostraram patogênicas para a cana, em intensidade variável, mas sempre provocando o aparecimento da doença entre as plantas inoculadas, enquanto as testemunhas se mantiveram com aspecto normal durante todo o praso das experiências, como se pode verificar pelos dados da Tabela 4.

TABELA 4

Experiências de inoculação com culturas da bacteria associada à "escaldadura das fôlhas", no Brasil

N.º da cultura	Data da inoculação	Mudas plantadas		Plantas infectadas após 2 meses		% de infecção
		Inoc.	Test.	Inoc.	Test.	
27	20 - 4 - 43	31	15	16	0	51,6
48	5 - 8 - 43	21	9	2	0	9,5
49	5 - 8 - 43	14	5	6	0	42,8
55	5 - 8 - 43	14	6	10	0	71,4
77	29 - 10 - 43	10	5	10	0	100,0

Nesta tabela foi incluida a cultura n.º 77, que representa o reisolamento da bacteria n.º 55.

Em épocas diferentes, o período de incubação e o modo de reagir das plantas variaram, muito provàvelmente por influência da temperatura. Nos casos das culturas 48, 49 e 55, os brotos provenientes dos toletes inoculados tinham, de início, a aparência de sãos. Um mês depois da data da inoculação, porém, os sinais de infecção podiam ser claramente notados, sob a forma de uma murcha e seca da extremidade das fôlhas basais. Essa murcha e seca progrediam em direção à base da fôlha. Nas mesmas plantas, as demais fôlhas, nesse tempo, já se mostravam um tanto cloróticas, amareladas, enquanto as testemunhas conservavam a côr verde normal das fôlhas. Algumas plantas murcharam e morreram, numa forma aguda da doença, mas a maioria delas reagiu, tendendo para o mascaramento dos sintomas, e mantendo-se nessa condição durante alguns meses. Mais tarde a doença reapareceu, na forma das estrias cloróticas, típica do estado crônico da "escaldadura". No caso da cultura 27, que foi inoculada no outono, quando predominava um tempo fresco, pouco favorável à vegetação da cana, como conseqüência disso os brotos levaram um tempo muito mais longo para emergir, e já vieram, na maioria, completamente cloróticos ou albinos. Nesta experiência também, as plantas que não nasceram albinas reagiram à doença e conservaram-se aparentemente sãs durante vários meses. Sòmente no quinto mês após a inoculação é que a doença reapareceu, desta vez causando a clorose completa ou albinismo das fôlhas novas do tôpo.

A cultura 77, que constitue o reisolamento da bactéria da 55, foi inoculada pelo mesmo processo, na variedade C.P. 29/291, causando 100% de infecção aos brotos originários dos toletes inoculados, ao passo que os brotos provenientes dos toletes testemunhas se con-

servaram perfeitamente sãos. Os brotos inoculados, logo depois da germinação apresentaram a doença numa forma aguda, que lhes causou a murcha e morte dentro de poucos dias.

Os resultados apresentados demonstram que todos isolamentos empregados, que tinham os mesmos caracteres culturais, morfológicos e fisiológicos, eram do agente da doença. A baixa porcentagem de infecção obtida com um dos isolamentos é considerada como resultante de termos usado uma variedade bastante tolerante à doença, que mostra grande tendência para o mascaramento dos sintomas. Tanto é assim que, no caso da cultura 77, em que empregamos uma variedade mais suscetível, não sòmente obtivemos 100% de infecção, como também a doença se apresentou numa forma muito mais grave do que em todos os outros.

A perfeita semelhança da bactéria estudada, em seus caracteres culturais, morfológicos e fisiológicos, com a *P. albilineans* já foi anteriormente discutida. A capacidade dessa bactéria, de causar uma doença perfeitamente idêntica à "escaldadura das fôlhas", foi cabalmente provada com os resultados destas experiências e de outras que serão mais adiante apresentadas.

DISSEMINAÇÃO

I — Considerações gerais

A maneira pela qual a doença se dissemina, no campo, é um assunto que tem sido objeto de estudo de vários autores, em diversos países; mas neste particular a literatura parece bastante contraditória. Muitos pontos importantes para um perfeito conhecimento da história da vida do patógeno ainda permanecem obscuros.

No Estado de São Paulo a doença parece ter encontrado condições favoráveis para a sua disseminação, a julgar pelo comportamento apresentado por algumas variedades de cana, que sabemos aqui terem sido introduzidas isentas da "escaldadura das fôlhas", porque foram importadas diretamente de regiões onde ela ainda não foi constatada. Êste é o caso da cana indiana Co. 281, e da variedade americana C.P. 29/320. A Co. 281, como vimos anteriormente, foi introduzida em 1925, e aqui contraiu a doença, apresentando-se hoje altamente infectada, em tôdas localidades onde é cultivada. A C.P. 29/320, que é uma das nossas importações mais recentes, apresenta-se hoje em dia, no início da sua multiplicação em larga escala, em mau estado de sanidade em todos lugares onde a temos encontrado, como se pode avaliar pela análise dos dados contidos na Tabela 5.

TABELA 5

Levantamento do gráu de incidência da "escaldadura das fôlhas" em canaviais da variedade C. P. 29/320

Localidade	Data da observação	Idade	Touceiras examinadas	Touceiras doentes	% infecção
Usina Tamoio . . .	14 - 3 - 44	C. planta	207	43	20,7
Usina Tamoio . . .	24 - 2 - 44	C. planta	58	8	13,7
Usina Tamoio . . .	24 - 2 - 44	C. soca 2.º corte	136	50	36,7
E. E. C. Aç. Piracicaba	30 - 5 - 44	C. planta	420	72	17,1
Idem	31 - 5 - 44	C. planta	121	42	34,7
Idem	17 - 5 - 44	C. soca 3.º corte	121	79	65,3

Êsses exemplos indicam que a doença se disseminou no campo, porque as variedades em questão a contraíram aqui. A sua disseminação foi relativamente rápida, principalmente no caso da variedade americana. Essa rapidez tem sido devida ao fato de que, desconhecendo a natureza infecciosa da doença, temos praticado uma seleção pouco rigorosa das mudas, na ocasião do plantio.

No campo a doença dissemina-se principalmente pela propagação de mudas infectadas, as quais constituem a fonte do inóculo para a infecção primária, cujo principal veículo é representado pelos facões empregados no corte das canas.

1) Disseminação pela propagação de mudas doentes

A "escaldadura das fôlhas" é uma doença sistêmica e de natureza incurável, que se transmite pelos toletes. Assim a consideraram WILBRINK (36) e NORTH (26), bem como outros autores que, seguindo-os, investigaram a questão.

Quando ainda não era conhecida a natureza da doença existente nos canaviais paulistas, realizamos algumas experiências, cujos resultados constituem um exemplo muito significativo para uma demonstração da transmissibilidade da "escaldadura das fôlhas" pelos toletes.

Por conveniência de exposição, abordaremos aqui apenas duas das experiências realizadas, cujos resultados serão apresentados e discutidos conjuntamente.

a) Experiências de transmissão da "escaldadura das fôlhas" pelo uso de mudas doentes

As variedades empregadas foram, num caso, a cana Co. 290, representando uma variedade resistente à doença, e noutro, a C.P. 29/320, do grupo das variedades suscetíveis. Usámos mudas apenas

de uma gema, sendo plantadas tôdas as gemas aproveitáveis dos colmos doentes, bem como as dos sãos. As mudas eram retiradas e plantadas, individualmente, em pequenos vasos de barro, que se transportaram para uma estufa à prova de insetos, onde foram conservados embutidos em serragem de madeira. No caso da Co. 290, os vasos foram etiquetados de maneira a se poder separar tôdas mudas provenientes de um mesmo colmo, bem como determinar a posição que cada uma delas ocupava na cana original. No caso da variedade C.P. 29/320, os colmos foram separados apenas em dois grupos: canas sãs e canas doentes. O número de mudas que serviam de testemunhas, isto é, provenientes de canas sãs, era igual ao de mudas doentes, para cada uma das variedades. A experiência com a variedade C.P. 29/320 foi iniciada em 16-4-43, e a da Co. 290, em 20-4-43. Outros dados sôbre essas experiências, bem como os resultados obtidos depois de 90 dias, estão condensados na Tabela 6.

TABELA 6

Estudo de transmissibilidade da "escaldadura das fôlhas", pelo uso de mudas doentes

Variedade	Colmo n.º	Mudas plantadas	Falhas	Plantas doentes	% de transmissão
Co. 290	1	8	0	8	100,0
	2	10	1	9	100,0
	3	8	1	7	100,0
	4	6	0	6	100,0
C. P. 29/320	Diversos	43	5	36	94,7

Não apareceu nenhum caso da doença entre as canas que nasceram dos toletes testemunhas, em ambas as variedades, ao passo que todos toletes provenientes de canas infectadas deram origem a plantinhas doentes, a maioria das quais morreu dentro do prazo da experiência (90 dias). Foram notados apenas dois casos de plantinhas aparentemente sãs, embora provenientes de toletes doentes, na variedade C.P. 29/320, os quais muito provàvelmente eram constituidos por plantas doentes com mascaramento dos sintomas.

Pelos resultados dessas experiências demonstra-se que, num colmo doente, tôdas gemas são capazes de transmitir a doença. Não foi notada diferença no aspecto de plantas doentes, provenientes quer das gemas das extremidades, quer das da base de um colmo infectado.

Diferenças foram notadas entre variedades. Assim é que, na variedade C.P. 29/320, a maioria das plantinhas oriundas de colmos infectados nascem parcial ou totalmente albinas e morrem

pouco tempo depois, ao passo que, na variedade Co. 290, muitas plantinhas apresentam a doença na sua forma mais benigna, apenas com as estrias cloróticas das fôlhas, mostrando acentuada tendência para um estado de mascaramento dos sintomas, principalmente quando as condições de umidade e temperatura são favoráveis à vegetação da cana.

Esta capacidade de reação à doença, apresentada pela Co. 290, é bastante acentuada. O mascaramento dos sintomas, muitas vêzes completos, se mantem por muito tempo. Encontram-se no campo, freqüentemente, touceiras que têm aspecto de perfeitamente sadias, e no entanto estão com a "escaldadura das fôlhas" numa forma latente. Êste estado de latência pode perdurar apenas durante uma estação de crescimento, com o reaparecimento dos sintomas durante o período de diminuição da vitalidade da cana, isto é, no da maturação. Sempre se mantem, entretanto, até a ocasião em que se escolhem as canas para mudas.

Temos comprovado experimentalmente que canas com a doença em estado de latência, quando usadas para muda, a transmitem. As plantas novas podem exibir os sintomas da doença desde o início, mas freqüentemente se conservam aparentemente sãs por muito tempo, principalmente se o grau de umidade do solo fôr favorável à vegetação.

Verificamos, acidentalmente, que o suco de cana Co. 290, com a "escaldadura das fôlhas" em estado de latência, pode transmitir a doença, numa forma grave, quando inoculado em plantas sãs, de variedades mais suscetíveis. A experiência seguinte demonstra êsse fato.

b) Experiência de transmissão mecânica da "escaldadura das fôlhas", com suco proveniente de plantas doentes.

Numa ocasião em que visavamos a transmissão mecânica do mosáico da Co. 290, para as canas americanas C.P. 29/291 e C.P. 31/294, tomamos dois lotes de plantinhas dessas variedades, com dois meses de idade, cultivadas individualmente em pequenos vasos de barro. Sabíamos que essas plantinhas estavam absolutamente livres de ambas as doenças, porque as duas variedades foram importadas em perfeito estado de sanidade, e aqui sempre as multiplicámos no interior de uma estufa à prova de insetos, sob constante observação.

O suco da Co. 290, empregado na inoculação, foi extraído de duas plantas originárias de um mesmo colmo, as quais, embora afetadas pelo mosáico, aparentavam estar completamente livres da "escaldadura das fôlhas". Por meio de uma máquina de picar carne, foi extraido das partes mais tenras do colmo e das fôlhas muito novas,

ainda enroladas, sendo em seguida coado em pano de algodãozinho. A inoculação foi realizada logo em seguida à extração do suco, empregando-se o processo de puncções com micro-alfinete.

Com uma pipeta esterilizada colocava-se uma gôta do suco na base de uma fôlha que, entre as completamente abertas, fôsse a mais nova, justamente no espaço cuneiforme que se forma entre a bainha de uma fôlha aberta e as das fôlhas internas, que ainda estão enroladas. Traspassavam-se repetidas vêzes, a fôlha externa e as internas, com uma pequena agulha de espetar insetos, através da gôta de suco. Plantas testemunhas foram submetidas ao mesmo tratamento, usando-se, porém, água esterilizada ao envez do suco.

Os resultados relativos à transmissão da "escaldadura das fôlhas", depois de quatro meses, encontram-se na Tabela 7.

TABELA 7

Inoculação das canas C. P. 29/291 e C. P. 31/294, com suco de Co. 290, contendo a "escaldadura das fôlhas" em latência

Variedade	Plantas inoculadas	Plantas testemunhas	Plantas infectadas		% de infecção
			Inoc.	Test.	
C. P. 29/291	10	5	3	0	30,0
C. P. 31/294	10	5	5	0	50,0

Tôdas plantas que contraíram a doença apresentaram os sintomas da forma crônica, em ambas as variedades. Na C. P. 29/291, houve um caso de albinismo total, seguido da morte da planta, e dois casos em que se notavam apenas as estrias das fôlhas. Na variedade C.P. 31/294, tôdas plantas infectadas apresentaram, finalmente, o completo albinismo das fôlhas do tôpo.

As socas originais da cana Co. 290 foram transplantadas para um terreno fresco, no campo, onde passaram durante todo o inverno de 1944 sem apresentar sintomas da doença. A experiência demonstra, entretanto, que se achavam infectadas pela "escaldadura das fôlhas", num estado de mascaramento dos sintomas.

As canas que mascaram os sintomas comportam-se de maneira idêntica às demais canas doentes, como elemento de propagação da doença ou como fonte de inóculo para a infecção primária.

2) Disseminação pelo facão

Ao que se sabe até agora, além da disseminação pela propagação de mudas doentes, o único modo importante de disseminação no campo, comprovado experimentalmente, é o da infecção primária, que se dá

pelo uso do facão, cortando-se indistintamente canas doentes e sãs, quer na ocasião do plantio, passando a doença de mudas infectadas para mudas bôas, quer na ocasião da safra, contaminando touceiras que tenham permanecido sãs durante o primeiro ano de vegetação.

O papel do facão, como veículo do patógeno na infecção primária, foi demonstrado por WILBRINK (36) e NORTH (26). Êstes autores provaram que, na ocasião da preparação das mudas, picando-se uma cana infectada e usando-se, a seguir, o mesmo facão para picar canas sãs, muitas das mudas destas últimas darão origem a plantas doentes. Como, na prática comum, as mudas são picadas e amontoadas de um lado, para depois serem distribuidas nos sulcos, por diversas pessoas, é claro que as mudas originariamente doentes e as que se infectaram na ocasião da repicagem, terão no campo uma distribuição inteiramente ao acaso. Constituirão focos esparsos da doença, que, mesmo admitindo-se a não existência de outros modos de disseminação, serão a fonte do inóculo a ser levado pelo facão às touceiras vizinhas, na ocasião da safra.

Ainda não temos dados experimentais que nos permitam avaliar, com precisão, a importância dêste modo de disseminação da "escaldadura das fôlhas" no Estado de S. Paulo, porque as nossas experiências a êsse respeito são representadas por ensaios de campo iniciados há pouco tempo. Mas os dados que temos, em relação ao comportamento da doença em plantações comerciais, em diversas localidades, tanto em cana-planta, como em cana-soca, autorizam-nos a supor que o facão constitue um importante veículo na disseminação da "escaldadura das fôlhas" nos canaviais paulistas. Os levantamentos que realizámos, com relação ao grau de incidência da doença, em diversas localidades e variedades, têm sempre revelado maior porcentagem de infecção nos campos de cana-soca do que nos de cana-planta, em igualdades de condições, como se pode verificar pela análise dos dados da Tabela 8.

TABELA 8

Levantamento do gráu de incidência da "escaldadura das fôlhas", em canaviais da variedade C P. 29/320

Localidade	Data de observação	Idade	Touceiras examinadas	Touceiras doentes	% de infecção
Usina Tamoio . . .	14 - 3 - 44	C. planta	207	43	20,7
Usina Tamoio . . .	24 - 2 - 44	C. soca 2.º corte	136	50	37,5
E. E. C. Aç. Piracicaba	30 - 5 - 44	C. planta	230	72	31,3
Idem	31 - 5 - 44	C. planta	420	42	10,0
Idem	17 - 5 - 44	C. soca 3.º corte	132	79	65,3

Além dessa maior porcentagem, sempre se nota que as plantas doentes apresentam a tendência para formar grupos numa mesma linha, ao passo que, nos campos de cana-planta, as touceiras doentes estão geralmente isoladas, ou em grupos de duas. Esta diferença entre os dois tipos de cultura, talvez se deva principalmente à influência do facão como veículo da infecção primária, na ocasião do corte da cana, quer para a moagem, quer para a produção de mudas.

Papel semelhante ao do facão é representado pela enxada, na operação, algures adotada, do rebaixamento das socas, para provocar melhor brotação das gemas basais. Esta razão é suficientemente forte para justificar o inteiro abandono desta prática cultural, que se torna perigosa.

3) Outros possíveis meios de disseminação

Embora se encontrem na literatura referências a observações da existência de outros meios de disseminação da doença no campo, tais observações não passam de hipóteses que dependem da necessária confirmação experimental.

Nêste grupo, duas hipóteses merecem especial atenção do investigador: disseminação pela infecção secundária, implicando a existência de um vetor da doença, e disseminação pelo contacto das raízes.

a) Disseminação pela infecção secundária

North (26) considera provável que a infecção secundária, por intermédio de um inseto alado, exista e seja de especial importância, em New South Wales. Formulou essa hipótese para explicar o comportamento da doença observado nas culturas intensivas e nos ensaios de campo, de que se ocupou durante muitos anos. Em abono desta mesma hipótese, Cottrell-Dormer (15) cita o fato de que "seedlings", nos quais nunca fôra empregado o facão, contrairam infecção nos viveiros. A única prova de transmissão experimental da "escaldadura das fôlhas" por meio de animais, de que temos conhecimento, é devida a Martin (22), que conseguiu transmitir a doença de touceiras infectadas para touceiras sãs, empregando como vetor o rato comum, encontrado nos canaviais de Hawaii.

Conquanto as observações que temos realizado, relativamente à distribuição de canas doentes e sãs nos canaviais, não sejam favoráveis à hipótese da existência de um vetor que esteja, presentemente, desempenhando papel importante na disseminação da doença, êste é um assunto que deve merecer a máxima atenção dos investigadores, mormente em se tratando de uma doença nova no Brasil, cuja fauna entomológica é muito rica e bastante diversa da do país de origem da "escaldadura das fôlhas".

b) Disseminação pelo contacto de raízes

Esta constitue uma outra hipótese à qual recorre North (26), para explicar a distribuição das canas doentes, com tendência para a formação de "reboleiras" ou manchas, no meio das plantas sãs, nas grandes culturas. Êste autor admite a possibilidade da disseminação, não sòmente entre plantas de uma mesma linha, mas também entre plantas de linhas diferentes, o que seria facilitado pelos tratos culturais, que ferem o sistema radicular das plantas. Essa distribuição das touceiras doentes, em "reboleiras", ainda não foi por nós encontrada no Estado. Admitimos como muito provável a disseminação pelo contacto das raízes, entre plantas vizinhas, numa mesma linha.

EPIFITOLOGIA

A "escaldadura das fôlhas" é uma doença cuja evolução e disseminação dependem, em grande parte, das condições mesológicas de cada região.

Na Austrália, por exemplo, a doença parece evoluir e disseminar-se de maneira muito mais grave no Estado de New South Wales, do que no Estado vizinho, de Queensland. No primeiro, North (26) a considera doença muito grave, baseando-se em dados estatísticos, que exprimem o vulto das perdas na variedade Mahona. No segundo, Bell (13) atualmente a considera de secundária importância econômica porque, em conseqüência do tempo sêco que predomina durante a primavera, as touceiras doentes murcham e morrem cêdo, nas variedades suscetíveis, desaparecendo assim os focos que se constituiriam em fonte de inóculo para a infecção primária, na ocasião do corte. Por esta razão, segundo êste mesmo autor (1), a disseminação natural, cujo único veículo importante é o facão, ocorre numa escala muito reduzida.

As condições de solo são de grande importância, segundo a opinião de vários autores. Bell, na carta citada, informa que, em Queensland, a "escaldadura das fôlhas" assume forma grave ùnicamente nos solos mal drenados e sujeitos a chuvas excessivas. Martin (21, 22) considera que tôdas as condições que provocam um desenvolvimento subnormal da cana, quais sejam infertilidade do solo e sêcas, influem desfavoràvelmente na capacidade de reação da planta à doença.

Como vimos estudando relativamente há pouco tempo o comportamento desta doença no Estado, ainda não temos dados experimentais que nos possibilitem aquilatar com precisão a importância de cada um dêsses fatôres, com relação ao desenvolvimento da doença nas nossas condições. Temos, entretanto, procurado realizar observa-

ções nêste particular, em várias regiões do Estado, inspecionando as plantações comerciais das nossas usinas.

Em geral temos constatado que a sêca influe muito no processo de desenvolvimento dos sintomas, imprimindo-lhe acentuada aceleração, no sentido de provocar a murcha e morte dos colmos afetados. Esta é uma reação muito natural, pelo fato de se tratar de uma doença vascular, que interfere, mesmo em condições normais do tempo, na circulação da água na planta.

Nem porisso podemos afirmar que a sêca seja favorável à doença. Ela apenas acelera o desenvolvimento do quadro sintomatológico, mas, nêste caso, como acontece com as outras doenças das plantas, representa um fator desfavorável para a disseminação da "escaldadura das fôlhas", porque dificulta a infecção. As nossas experiências de inoculação têm revelado tratar-se de uma doença altamente infecciosa, em condições favoráveis de umidade; porém, quando à inoculação sobrevem um período relativamente longo de sêca, a porcentagem decresce sensìvelmente.

Analisando o clima do Estado de São Paulo, com relação às chuvas, podemos dividí-lo, grosseiramente, em duas estações: a das águas, compreendendo a primavera e o verão, e a das sêcas, no outono e no inverno. Vemos, portanto, que uma parte da safra ou corte da cana, que é, provàvelmente, a principal operação disseminadora da "escaldadura das fôlhas", é realizada em condições desfavoráveis para a infecção, por falta de umidade; outra parte, entretanto, é feita quando há umidade suficiente para o desenvolvimento dêsse processo. O corte de canas destinadas à produção de mudas, bem como o plantio, que são operações condicionadas pelo fator umidade, realizam-se justamente sob condições que facilitam a infecção e, portanto, a disseminação da doença. Tanto em relação à cana-de-ano, como à de ano-e-meio, ao plantio segue-se um período maior ou menor de chuvas, o qual favorece o desenvolvimento e multiplicação do patógeno nos tecidos do hospedeiro. Mas sendo essas mesmas condições propícias ao desenvolvimento vegetativo da cana, há por parte desta maior reação ao patógeno, e, em conseqüência, resulta o aparecimento dos sintomas da doença na sua forma mais benigna, a forma crônica, nas variedades suscetíveis, enquanto nas variedades resistentes ou tolerantes, muito freqüentemente se observa o completo mascaramento dos sintomas.

Do mês de março em diante, cessando as chuvas, vem uma conseqüente paralização do crescimento da planta e dá-se a aceleração no processo de desenvolvimento da "escaldadura das fôlhas".

Pelas razões expostas, vemos que atualmente a doença parece encontrar no nosso clima as chuvas necessárias para a infecção, e as sêcas responsáveis pelo enfraquecimento do fator resistência do hospedeiro, fator êste que, numa maior ou menor escala, conforme a variedade, regula o equilíbrio na luta entre planta e patógeno.

CONTROLE

Uma vez que a "escaldadura das fôlhas" se estabeleceu firmemente nos canaviais paulistas, não se pode mais pensar no emprego de medidas que visem sua erradicação das áreas infestadas. As razões expostas anteriormente, acerca da importância econômica da doença, justificam a adoção, desde já, de tôdas as medidas de contrôle que possam ser aplicadas para evitar a sua livre disseminação e conservar em bom estado de sanidade as variedades mais importantes, de algumas das quais depende o sucesso da indústria açucareira paulista.

As medidas de controle mais importantes, são as preconizadas por WILBRINK (36), NORTH (26, 27), e MARTIN, CARPENTER & WELLER (25).

De um modo geral podemos dizer que essas medidas se baseiam nos seguintes princípios:

I — Emprego de variedades resistentes;
II — Seleção de mudas e prática do "roguing";
III — Tratamento das mudas pela água quente.

I — EMPRÊGO DE VARIEDADES RESISTENTES

Para se poder adotar esta medida de controle, é primeiramente necessário que se conheça o grau de suscetibilidade das variedades, para depois, atendendo-se no máximo possível às exigências da indústria, escolherem-se quais as canas que devam ser cultivadas.

Na literatura há listas de variedades nas quais os autores procuram formar grupos, baseando-se no grau de suscetibilidade maior ou menor de cada cana à doença. Estas listas são de pouco ou nenhum valor prático para nós, pois tratam quase exclusivamente de variedades desconhecidas aqui.

Todavia, do ponto de vista técnico, interessa-nos conhecer como se comportam essas variedades, porque a nossa indústria açucareira depende hoje, como sempre dependeu, da importação e aclimação de variedades estrangeiras. Além disso, êsses conhecimentos são de especial importância para todos quantos estejam interessados em desenvolver um programa de melhoramento da cana, em o nosso meio. Por estas razões resolvemos fazer um apanhado das conclusões a que che-

garam os principais investigadores que se ocuparam do assunto em outros países.

WILBRINK (36) estudou o comportamento das variedades de Java, e baseando-se em observações de campo e dados experimentais, classificou-as do seguinte modo:

Muito sensíveis	Sensíveis	Levemente sensíveis
E. K. 2	E. K. 28	Fiji
Parda 100	D. I. 52	P. K. I.
Borneu Preta	S. W. 3	B. 247
Batjan Amarela	P. O. J. 826	Kassoer
B. 221	F. 90	
B. 36	Tjepering	
Lahaina	Cheribon Preta	
P. O. J. 213	Chunnee	
P. O. J. 979	Loethers	
P. O. J. 100		

Para as variedades australianas, NORTH (27) organizou a seguinte lista:

Suscetíveis	Moderadamente resistentes	Altamente resistentes
Mahona	Nameno	Malabar
H. Q. 243	Oramboo	N. G. 14
7. R. 96	Korpi	Innes 131
8. R. 31	Pompey (7. R. 428)	D 1135
H. Q. 114	Goru and Sports	H. 109
	(N. G. 24, 24A, 24B).	H. Q. 5
	N. G. 16	H. Q. 409
	M. 1900	Q. 813
	Seedling	

Ainda na Austrália, BELL organizou nova lista, com o comportamento de algumas variedades não consideradas por NORTH, lista essa que transcrevemos de MARTIN, CARPENTER & WELLER (25).

Altamente resistentes	Resistentes	Moderadamente resistentes	Suscetíveis mas tolerantes	Suscetíveis	Muito suscetíveis
D 1135	M. 1900	P. O. J. 2878	Badila	H. Q. 426	E. K. 28
M 189	H. 109	P. O. J. 2714	S. J. 4	Goru	
Uba		Pompey			
Q. 803		Oramboo			
H. Q. 409		Nameno			
		Korpi			

Posteriormente, BELL (11), em experiências de inoculação artificial, estudou o comportamento de 12 novas variedades, que são: *Co. 270, Co. 421, 24 R 1057, 25 R 96, 25 R 408, 25 R 491, 30 M. Q. 2124, Vulcan, Q. 2, Q. 10, Q. 1098* e *30 R 61*. Diz o autor que não foram observadas touceiras doentes entre as 11 primeiras variedades, mais a P. O. J. 2878, enquanto, nas mesmas condições, 75% das touceiras da variedade *30 R 61* se mostram doentes.

Os resultados que BELL apresenta (12), acêrca dos ensaios de campo mais recentes, nos quais foram incluidas novas variedades, são expressos em porcentagem de infecção, como índice de suscetibilidade:

Variedade	% de infecção	Variedade	% de infecção
Atlas	3,00	H. Q. 409	31,00
Badila	39,00	H. Q. 426	78,00
B. 726	39,00	Korpi	50,00
B. 2935	4,00	Marcus	13,00
C. P. 29/116	0	Oramboo	33,00
C. P. 807	0	Q. 20	23,00
Cato	24,00	Q. 25	3,00
Comus	6,00	31/1389	14,00
D. 1135	0		

Das canas cultivadas em Hawaii, MARTIN e seus colaboradores (25) consideram as variedades *Yellow Tip*, (Ponta Amarela), *Striped Tip* (Ponta Riscada), *Manoa 160, 185, 186* e *195*, e *Kohala 107* e *202*, como as mais suscetíveis. Segundo MARTIN (21), das variedades comerciais mais importantes, a P. O. J. 2878 é a mais resistente, encabeçando uma lista que, na ordem ascendente da suscetibilidade, é a seguinte: *P. O. J. 2728, P. O. J. 36, D 1135, H. 109, Yellow Caledonia,* - (Caledonia amarela), e *Tip Canes*, - (as variedades *Striped Tip* e *Yellow Tip*, acima referidas). Mais recentemente MARTIN (23) refere-se a duas novas canas, *28-4291* e *29-3859*, como sendo tão intensa-

mente atacadas quanto se mostrou a *Yellow Caledonia*, ao passo que as variedades *32-1063* e *32-8560* nunca foram por êle observadas doentes, mesmo em ensaios nos quais os toletes haviam sido prèviamente inoculados. MARTIN (24) refere-se ainda ao fato de que estas duas últimas variedades deram ótima produção em terrenos onde, no ano anterior, a incidência da "escaldadura das fôlhas" fôra muito elevada.

No Estado de São Paulo não se poderia avaliar com precisão o grau de suscetibilidade das diferentes variedades, pela simples observação do seu comportamento nas grandes culturas, devido ao fato, anteriormente apontado, da "escaldadura das fôlhas" apresentar um baixo grau de incidência nas variedades mais largamente cultivadas. Uma classificação que tivesse por base exclusivamente o grau de incidência da doença, revelado por levantamentos efetuados em várias localidades, poderia levar-nos a falsas conclusões, porque as oportunidades de contrair infecção não foram as mesmas para tôdas as variedades. E como a doença é de disseminação relativamente lenta, essas diferenças iniciais iriam certamente influir desfavoravelmente nos resultados.

Com o objetivo de colher algumas informações a êste respeito e para selecionar material destinado a ensaios de campo em larga escala, foi planejada e executada uma experiência de inoculação artificial, na qual procuramos acompanhar a reação à doença, de 13 variedades de cana.

1) Experiência sôbre o comportamento de 13 variedades de cana, em relação à "escaldadura das fôlhas"

As 13 variedades escolhidas para esta experiência foram as seguintes: *P. O. J. 213, P. O. J. 2878, P. O. J. 2725, P. O. J. 100, Co. 290, Co. 281, C.P. 27/139, C.P. 28/11, C.P. 28/60, C.P. 28/19, C.P. 29/320, C.P. 11/65* e *U.S. 1694.*

Serviu de fonte das mudas um mostruário de variedades, no qual tôdas as touceiras escolhidas tinham um ano de idade. Para cada variedade colheram-se seis colmos, aparentemente sãos (7). De cada colmo retiravam-se 5 mudas de uma gema, sendo 4 inoculadas e 1 conservada para o grupo das testemunhas. Terminada a operação, tinhamos, pois, para cada variedade, 6 x 4 = 24 mudas inoculadas, e 6 mudas, correspondentes ao lote testemunha.

O inóculo consistiu numa suspensão bacteriana em água esterilizada, preparada com culturas da nossa amostra N.º 86, de *P.*

(7) Os colmos da P. O. J. 213, bem como os da Co. 281, estavam infectados pelo mosáico, porque esta doença já chega a constituir um caraterístico dessas variedades nas nossas condições.

albilineans, cultivada em meio de sacarose e peptona de WILBRINK, com 6 dias de idade e à temperatura de 26° C.

A inoculação foi praticada nos toletes por meio de um aparelho inoculador (Estampa 14, fig. *I*), que é a simplificação de um dos tipos idealizados por BELL (8). Consta de um tubo de ferro galvanizado, de 2 1/2 polegadas de comprimento por 1 1/2 polegadas de diâmetro, assentado sôbre uma chapa de aço, servida de base. No fundo do recipiente assim formado, estão soldados dois preguinhos de 2 cm de comprimento, com as pontas voltadas para cima. A suspensão bacteriana é despejada no recipiente até atingir o nível da extremidade dos preguinhos. A inoculação se faz introduzindo-se o tolete no inoculador, e forçando-o contra os preguinhos, até atingir a base. A operação se repete para a inoculação da outra extremidade do tolete.

Os toletes-testemunhas receberam o mesmo tratamento mecânico que os inoculados, usando-se porém, água esterilizada ao envez da suspensão bacteriana, e estando o aparelho, prèviamente esterilizado.

As mudas, testemunhas e inoculadas, foram imediatamente plantadas em pequenos vasos de barro contendo terra esterilizada. Êstes foram dispostos no interior de uma estufa à prova de insetos, formando 13 grupos de 30 vasos cada um. Em cada grupo havia 5 linhas de 6 vasos, das quais as 4 da direita eram das mudas inoculadas e a da esquerda, das testemunhas (Estampa 15, fig. *J*). Todos os vasos foram conservados embutidos em serragem de madeira, enquanto durou a experiência.

A experiência foi iniciada em 28-1-44 e a observação final foi realizada em 13-5-44, durando, pràticamente, 4 meses.

O critério adotado para o julgamento do grau de suscetibilidade das variedades foi baseado num sistema de notas, segundo o qual as plantas que apresentavam a doença na sua forma mais benigna recebiam a nota 1, e as mais afetadas de tôdas recebiam 12 pontos, ficando a nota 0 reservada para as plantas aparentemente sãs. Para facilitar o julgamento, as plantas doentes eram classificadas em 4 grupos, de acôrdo com a natureza dos sintomas apresentados. Dentro de cada grupo, a que correspondiam 3 graus, a planta recebia a nota máxima ou a mínima, de acôrdo com a maior ou menor intensidade dos sintomas que apresentasse.

Os grupos assim estabelecidos, com os seus respectivos graus, são os seguintes:

GRUPO I —	Plantas apenas com estrias das fôlhas, manifestando acentuada tendência para o restabelecimento	1 a 3 graus.
GRUPO II —	Plantas parcialmente albinas	4 a 6 graus.
GRUPO III —	Plantas totalmente albinas	7 a 9 graus.
GRUPO IV —	Plantas que apresentavam a doença na sua forma aguda e que morreram durante o primeiro mês	10 a 12 graus.

O julgamento final do grau de suscetibilidade da variedade, foi baseado no total dos pontos recebidos pelas 24 plantas inoculadas, observada a seguinte escala:

Até 100 pontos	Variedade Resistente.
Entre 100 e 150 pontos	Variedade Moderadamente Resistente.
Entre 150 e 200 pontos	Variedade Moderadamente Suscetível.
Mais de 200 pontos	Variedade Suscetível.

2) Resultados e discussão

Os resultados obtidos estão condensados na Tabela 9.

TABELA 9

Avaliação do grau de suscetibilidade e classificação de 13 variedades de cana, artificialmente inoculadas com a *P. albilineans*

Classificação	Variedades	Pontos
Resistentes	P. O. J. 2725	73
	C. P. 11/65	83
	Co. 290	92
	U. S. 1694	96
Medianamente resistentes	P. O. J. 2878	101
	P. O. J. 100	136
Medianamente suscetíveis	C. P. 28/11	162
	C. P. 29/320	171
	Co. 281	180
	C. P. 27/139	183
Suscetíveis	C. P. 28/19	205
	P. O. J. 213	210
	C. P. 28/60	220

Das observações realizadas no decurso da experiência, convém ressaltar o comportamento das variedades comercialmente mais importantes. Em primeiro lugar está a Co. 290, de cujas plantas a maioria

foi incluida no 1.º Grupo de sintomas, recebendo de 1 a 3 pontos, por apresentar a forma mais benigna da doença, com tendência para o restabelecimento (Estampa 15, fig. *K*). Apenas umas poucas plantas foram incluidas no 4.º Grupo, (10-12 pontos), estando ausentes os tipos dos Grupos 2.º e 3.º. Na P. O. J. 213, foi grande o número de plantas incluidas no 4.º Grupo e pequeno o das do 1.º Grupo, contando também com os tipos III e II. A C. P. 27/139 apresentou um apreciável número de plantas do 4.º Grupo, mas também foram muitas as plantas do Grupo 1.º, devido à acentuada tendência desta variedade para o restabelecimento, maior, ainda, aparentemente, do que a da Co. 290. A Co. 281 forma, com as canas americanas suas descendentes, C. P. 28/11, C. P. 28/19, C. P. 28/60, e C. P. 29/320, um grupo de comportamento muito especial, com a predominância dos tipos intermediários II e III (Estampa 12, fig. *C*). São variedades de muito pouca tendência para o restabelecimento.

A acentuada tolerância da variedade Co. 290, que se vinha observando nas grandes culturas, foi plenamente confirmada nesta experiência. No geral as canas provenientes de toletes doentes apresentam tendência para um aparente restabelecimento, com o completo mascaramento dos sintomas e crescimento normal, quando sob condições favoráveis. No campo, os sintomas agudos da doença sòmente são observados com freqüência quando as condições de solo e clima são desfavoráveis à vegetação da planta.

A C. P. 27/139, que no campo se mostra aparentemente muito resistente, não foi classificada favoràvelmente, devido exclusivamente ao fato de ter morrido um maior número de plantas logo no primeiro mês após o plantio. Mas considerando-se a acentuada tendência ao restabelecimento, apresentada pelas plantas, compreende-se que, nas condições de campo, ela se comporte realmente como uma variedade muito resistente.

Semelhante comportamento, entre as variedades cultivadas na Austrália, é citado por BELL (9), para certas canas que poderiam chamar-se comercialmente resistentes.

A P. O. J. 213 apresentou elevadíssima porcentagem de plantas que morreram na fase inicial de crescimento, não mostrando, por outro lado, a mesma capacidade de reação à doença, característica da C. P. 27/139 e Co. 290. As plantas que sobreviveram apresentavam os sintomas característicos da forma crônica, num estado benigno. Devido a essa moderada capacidade de mascaramento dos sintomas, demonstrada pela P. O. J. 213, queremos crer que a baixa porcentagem de infecção que apresenta, nas grandes culturas, seja mais uma questão de falta de oportunidade para contrair a doença do que

resistência própria da variedade. Isto se poderia explicar como sendo uma conseqüência do fato desta variedade ter sido aqui introduzida, multiplicada e cultivada em larga escala em tôdas as usinas, provàvelmente em data muito anterior à da introdução da doença. Como as usinas não tinham necessidade de comprar mudas desta variedade, a doença só foi levada para ela com as novas variedades. Assim mesmo, como a área cultivada com a variedade em questão sempre foi muito grande, a probabilidade de, na ocasião do plantio, se multiplicarem mudas doentes, era pequena.

O grupo da Co. 281 e suas descendentes americanas parece constituido pelas piores variedades, do ponto de vista comercial. Em tôdas elas a doença tem a tendência de se apresentar com sintomas fortes da forma crônica, causando acentuado enfezamento e conseqüente redução de tonelagem.

O comportamento dêste grupo de variedades é especialmente interessante do ponto de vista do melhoramento da cana no nosso meio, onde, aparentemente, a Co. 281, que é uma cana dotada de muito boas qualidades, não seria um tipo desejável, porque daria muito provàvelmente progenies com alta porcentagem de indivíduos suscetíveis. Isso se torna mais significativo quando nos recordamos do comportamento das canas C. P. 28/11 e C. P. 28/19, produtos do cruzamento Co. 281 x U. S. 1694, as quais, mesmo com um dos pais resistente, (U. S. 1694), ainda são suscetíveis.

Nêste particular, são muito interessantes as observações de BELL (7), segundo as quais há evidências de que todos cruzamentos nos quais entre a cana N. G. 24 como um dos pais, as progenies apresentam grande proporção de indivíduos suscetíveis. Estudando, por meio de inoculações artificiais, canas provenientes de 32 cruzamentos diferentes, BELL (6) observou uma incidência de 98% de touceiras doentes, no caso do cruzamento N. G. 24 x E. K. 28, contra 0% nos casos dos cruzamentos N. G. 15 x S. C. 12/4 e P. O. J. 2364 x S. C. 12/4.

Considerando o comportamento das variedades nas grandes culturas, e levando em conta os resultados experimentais, as principais variedades poderiam ser tentativamente relacionadas, de acôrdo com o grau de resistência comercial, do seguinte modo:

P. O. J. 2725
C. P. 27/139
Co. 290
P. O. J. 2878
P. O. J. 213
Co. 281

C. P. 28/11
C. P. 29/320
C. P. 28/19.

O controle da "escaldadura das fôlhas" exclusivamente pelo emprego de variedades resistentes é uma medida que não deveria atualmente ser preconizada, porque as duas variedades comercialmente resistentes e que são largamente cultivadas, (Co. 290 e C. P. 27/139), não são variedades precoces. Além disso, a segunda variedade ainda parece apresentar o inconveniente de produzir má cana-soca, quando se efetua o corte no início da safra. Por esta razão, nenhuma usina bem organizada, como já foi dito, poderia prescindir do cultivo de certa porcentagem de variedades precoces, tais como P. O. J. 213, Co. 281 e, talvez, algumas das canas americanas, C. P. 29/320, C. P. 28/11, C. P. 28/19, as quais tornam possível a antecipação da safra, o que é de grande interêsse para todas as usinas.

Torna-se indispensável, portanto, a adopção de outras medidas de contrôle, quais sejam a seleção de mudas e a prática do *"roguing"*, de que trataremos no capítulo seguinte.

II — Seleção de mudas e "roguing"

A seleção de mudas e o *"roguing"*, ou seja, a erradicação das plantas doentes, são medidas que vêm sendo adotadas com muito bons resultados no contrôle das principais doenças da cana de açucar, em vários países. E' claro que não se poderia pensar em aplicar essas medidas com o sistema de cultivo vigente na maioria das usinas paulistas, que é o de se colherem canas a esmo, para a preparação das mudas necessárias à renovação anual dos canaviais. Seria, portanto, necessária a formação de viveiros especiais, destinados exclusivamente à produção de mudas.

Procede-se desta forma em países como os Estados Unidos, onde o salário do operário é muito elevado, e ainda se considera vantajosa e econômica a medida, que visa exclusivamente o contrôle do mosaico. No Estado de São Paulo, onde não é de menor importância o problema desta doença de virus, a introdução da "escaldadura das fôlhas" vem evidenciar a absoluta necessidade de se abandonar o sistema antigo, para cuidar da produção de mudas selecionadas, visando a conservação das nossas atuais variedades.

A produção de mudas selecionadas pela aplicação do "roguing", no contrôle da "escaldadura das fôlhas", foi preconizada por Wilbrink (36), em Java, por North (26), na Austrália, e por Martin, Carpenter & Weller (25), em Hawaii. Todos êsses autores, embora considerem indispensável esta medida, apontam as dificuldades encontra-

das no seu emprego, devido à particularidade que tem a doença, de se apresentar freqüêntemente no estado de latência.

Segundo NORTH (26), no caso de variedades suscetíveis, como a Mahona, para efeito da escolha das canas destinadas à produção de mudas, os canaviais podem ser classificados, em relação ao estado de sanidade, do seguinte modo:

Seguros — canaviais aparentemente sãos e situados a uma distância maior do que 1/4 de milha, dos canaviais doentes;

Duvidosos — canaviais aparentemente sãos, mas situados a uma distância menor do que 1/4 de milha, dos canaviais doentes;

Doentes — canaviais nos quais se tenham encontrado touceiras afetadas.

NORTH aconselha que só se escolhem canas para mudas em canaviais do 1.o tipo, porque as suas experiências revelaram que as canas originárias de canaviais do 2.º e 3.º tipos, quando plantadas, davam quasi sempre origem a certo número de plantas doentes, e que a erradicação da doença das plantações novas não fôra possível. Por outro lado, MARTIN, CARPENTER & WELLER citam o fato do aparecimento da doença na ilha de Oahu, em Hawaii, e seu aparente desaparecimento, uma vez erradicadas as plantas afetadas.

O estudo da produção de mudas selecionadas no nosso meio é um dos problemas aos quais temos dispensado maior atenção, por considera-lo de vital importância para a nossa indústria açucareira. O principal motivo dêsse nosso interêsse baseia-se no fato de que a indústria açucareira paulista depende de um pequeno número de variedades estrangeiras, as quais, se viessem a degenerar por motivo de doenças, criariam serias dificuldades às usinas, porque muito dificilmente poderiam ser ràpidamente substituidas. Merece especial atenção, nêste particular, a Co. 290, que é a variedade mais produtiva e mais largamente cultivada entre nós. Esta cana indiana, além de estar infectada pela "escaldadura das fôlhas" encontra-se com alta porcentagem de mosáico, em todas plantações comerciais, razões que nos fazem crer esteja ela em perigo de degenerescência. Esta é a razão por que resolvemos estudar experimentalmente a viabilidade da produção de mudas selecionadas pela prática do *roguing*, para esta variedade e algumas canas americanas, que presentemente necessitam de especiais cuidados.

Para isso foi iniciada, em Janeiro de 1944, uma experiência constando de uma série de campos, localizados em Campinas, na Fazenda Experimental Mato Dentro, e em Tamoio, na Usina da Refi-

nadora Paulista S. A. Conquanto o objetivo final da experiência ainda não tenha sido atingido, as observações já realizadas, exclusivamente com relação à "escaldadura das fôlhas", fornecem-nos importantes elementos para a discussão de alguns aspectos do problema que pretendemos abordar.

1) Experiência sôbre produção de mudas selecionadas pela prática do "roguing"

Todos os campos foram instalados nas proximidades de canaviais velhos, nas mais favoráveis condições, portanto, para a disseminação do mosáico e, talvez, da "escaldadura das fôlhas", porque desejavamos verificar se a medida em questão é viável e econômica, mesmo para quem não disponha de terras suficientemente isoladas, como seria de desejar-se para a instalação dos viveiros.

As mudas plantadas foram todas de 2 e 3 gemas, como se usa nas usinas, tendo sido prèviamente selecionadas pelo autor como aparentemente sãs, nos canaviais de c a n a - p l a n t a que apresentavam a melhor aparência. Sómente se escolheram touceiras que não tivessem nenhuma cana com sintomas da doença. Isso tornou mais difícil a escolha das mudas da variedade C. P. 29/320, cujo campo apresentava 20,7 por cento de touceiras doentes, revelados por um levantamento adrede realizado.

A tabela 10 dá as variedades usadas nesta experiência, as localidades, áreas e datas correspondentes.

TABELA 10

Dados sôbre os campos de seleção de mudas e *roguing*, instalados em 1944

Campo N.º	Localidade	Variedade	Área ms.2	Data plantio
1	Campinas	Co. 290	1.000	5 - 2 - 44
2	Tamoio	Co. 290	6.000	30 - 2 - 44
3	Tamoio	C. P. 28/11	6.000	16 - 3 - 44
4	Tamoio	C. P. 29/320	6.000	16 - 3 - 44

2) Resultados e discussão

As inspeções foram sempre realizadas a intervalos nunca superiores a 2 mêses. Sempre um operário fazia o arrancamento das plantas por nós indicadas. Os resultados obtidos até o mês de Julho, encontram-se na Tabela 11.

TABELA 11

Relação das touceiras erradicadas, devido à "escaldadura das fôlhas", nas três primeiras inspecções aos campos de seleção de mudas

Campo n.º	Touceiras erradicadas			Total
	1.ª inspecção Abril	2.ª inspecção Maio	3.ª inspecção Julho	
1	23	10	—	33
2	21	5	37	63
3	2	—	—	2
4	43	46	100	209

Considerando-se o número de touceiras existente em cada campo, a quantidade total de touceiras erradicadas representa uma porcentagem baixa de incidência da doença. Nos campos 1 e 2, onde foi possivel contar o total de touceiras, por se tratar de área pequena, no 1.º caso, e em virtude da plantação ter sido feita em covas, no segundo, verificámos que os totais da Tabela 10 representam uma incidência de 2,3% e 1,9%, respectivamente para cada campo. O campo 3, do qual foram eliminadas apenas 2 touceiras, mostra que a variedade C. P. 28/11, não obstante ser muito suscetivel à "escaldadura das fôlhas", encontra-se em muito bom estado de sanidade, na Usina Tamoio. O número sempre crescente de touceiras arrancadas, nas sucessivas inspecções, no caso do campo 4, constitue uma indicação de que muito dificilmente conseguiríamos purificar a variedade C. P. 29/320 apenas com um ano de cultivo sob as condições da experiência, embora acreditemos que poderá ser muito melhorada em relação ao seu estado inicial. Isto também se poderia dizer com relação a todos os nossos campos da variedade Co. 290, principalmente devido a dificuldades apontadas por vários autores, criadas pelas plantas que contêm a doença na forma de latência.

O comportamento apresentado pelas plantas doentes nas diferentes inspecções foi muito interessante como um exemplo da reação delas às condições climatéricas, e que constitue um elemento favorável ao sucesso da operação do *roguing* em o nosso meio. De um modo geral, a maioria das touceiras doentes apresentava, na primeira inspeção, sintomas muito leves da forma crônica. Na 2.ª e 3.ª inspeções, quando já se notava o efeito da sêca nas plantas, as touceiras doentes passaram a exibir, na maioria sintomas fortes da forma crônica ou da forma aguda, isto é, murchamento repentino das fôlhas. Foram freqüêntes, especialmente na última inspeção, os casos de touceiras com uma revelação parcial de infecção, isto é, dos três grupos de brotos pertencentes a um mesmo tolete, um apresentava os sintomas

típicos da doença e os outros dois estavam aparentemente sãos, não obstante fossem doentes e mascarassem os sintomas. Esta diferença de comportamento apresentada por diversas gemas de uma mesma muda, não representa inconveniente algum, porque nêste caso o encontro de um broto doente é suficiente para que se condenem todos os outros de mesma origem. Mas como esta diferença se pode dar entre os 3-5 toletes provenientes de um mesmo colmo afetado, que são todos doentes, porque a doença é de natureza sistêmica, o trabalho de purificação de uma variedade é prejudicado, pois na ausência de sintomas não dispõe o observador de um meio de localizar, para a destruição, os casos de latência, que constituem focos de disseminação da doença.

As dificuldades acima apontadas podem ser em grande parte reduzidas, pela adoção de um sistêma de plantio, a que poderiamos chamar de c o l m o s - m u d a s, e que é o processo adotado nos Estados Unidos, consistindo em plantar-se, ao envez dos toletes de 2-3 gemas, colmos inteiros, com todas as gemas aproveitáveis. Entretanto não se deverá, nêste caso, praticar a repicagem das canas, depois de distribuidas nos sulcos, como se faz nos EE. UU., para as canas relativamente tortas, como a C. P. 28/11 e a C. P. 28/19, pois esta operação favorece a disseminação da doença.

Assim procedendo, evitar-se-á a distribuição dos casos de latência ao acaso, o que se dá na plantação pelo sistêma dos toletes. O sistema dos c o l m o s - m u d a s ainda possibilitaria a separação de uma m u d a - í n d i c e, para cada colmo, apenas com uma gema, a ser cultivada e mantida em observação, sob condições favoráveis à manifestação dos sintomas.

Processos auxiliares de diagnóstico da doença, tais como o isolamento do organismo em cultura pura e a inoculação de suco em plantas-contrôle, para os quais se usaria o palmito da cana, bem como o processo das mudas-índices, poderiam ser adotados, na fase preliminar da purificação de uma variedade.

O sistema dos c o l m o s - m u d a s apresenta uma pequena desvantagem em relação ao sistema dos toletes, que é requerer um plantio mais profundo que o habitual, para evitar a exposição das pontas, à qual estão sujeitas as mudas longas, devido ao arqueamento que apresentam, à medida que vão secando: êsse aumento da profundidade de plantio implica numa certa redução na produção, especialmente da cana-planta, que é a que mais nos interessa como demonstraram AGUIRRE, ARRUDA & RODRIGUEZ (1).

Sendo o que se visa com os campos de seleção de mudas, controlar não sòmente a "escaldadura das fôlhas" mas também o mosáico, cuja disseminação se dá principalmente pela infecção secundária,

causada por insetos vetores alados, do grupo dos afideos ou pulgões, os viveiros devem ser instalados em lugares o mais distante possivel das plantações comerciais de cana e dos milharais.

E' desta medida de contrôle que acreditamos depender o sucesso no cultivo das variedades suscetiveis, no Estado de São Paulo, as quais, por serem na maioria precoces, são indispensáveis em qualquer usina bem organizada. A natureza dos resultados certamente dependerá do gráu de habilidade e da dedicação dos operários encarregados da execução do *roguing*.

III — Tratamento das mudas pela água quente

O tratamento das mudas pela água quente, que é de grande eficiência na cura das doenças *serê* e "*chlorotic streak*", tem sido experimentado e preconizado, no controle da "escaldadura das fôlhas", especialmente por MARTIN e seus colaboradores (25), em Hawaii. Consideravam como muito promissor o tratamento pela imersão dos toletes em água à temperatura de 52° C, durante 20 minutos, ressaltando a necessidade de se realizarem ensaios preliminares para o estudo da reação ao tratamento, das diferentes variedades e nas diferentes condições locais. Mais recentemente, entretanto, MARTIN (24) opina que o tratamento não pode ser usado como medida satisfatória para o contrôle da "escaldadura".

Na fase inicial dos nossos trabalhos, quando ainda não havíamos identificado a doença e admitíamos a possibilidade de se tratar da "*chlorotic streak*", executámos duas experiências para estudar o valor desta medida de contrôle no tratamento da doença paulista. Empregámos a variedade C. P. 29/320, que apresentava a vantagem de ser muito suscetível à doença em estudo e por ser de comportamento perfeitamente conhecido, com relação a êste tratamento, depois dos estudos de LUKE (20). A principal diferença entre as duas experiências consistiu em que uma foi realizada na estufa, sob ótimas condições de umidade, e a outra no campo, dependendo o fator umidade exclusivamente das chuvas.

1) Experiências de estufa, sôbre o tratamento de mudas pela água quente

O material que serviu para esta experiência foi colhido na Estação Experimental de Piracicaba, num campo de cana-soca de 2.° corte. Inicialmente foi separado em dois lotes: um de colmos doentes e outro de colmos sãos. Chamámos colmos doentes os provenientes de canas cujas fôlhas, no campo, exibiam os sintomas típicos da doença. Sãos foram considerados os colmos provenientes de touceiras nas quais tôdas as canas se achavam aparentemente sãs.

Repicámos primeiramente todos os colmos em 3 pedaços de 3 gemas cada um, de modo a obter, de cada colmo, três partes, correspondendo uma ao pé, outra ao meio e a 3.ª à ponta da cana. Procedemos de modo idêntico com relação aos colmos doentes.

A temperatura da água e o tempo de imersão escolhidos para o tratamento foram os indicados por MARTIN e seus colaboradores (25), isto é, 52° C, durante 20 minutos. O tanque em que foram tratadas as mudas continha aproximadamente o volume de 1 metro cúbico de água, e estava provido de dois agitadores fixados a um eixo acionado por motor elétrico.

A temperatura foi primeiramente elevada a 53° C, mergulhando-se, então, o lote de colmos sãos, e tomando-se tôdas as precauções para que permanecessem completamente submersos, durante os 20 minutos prescritos. O mesmo tratamento foi dispensado aos colmos doentes. Em ambos os casos a temperatura caiu para 52° C, imediatamente após a imersão dos pedaços de cana. Esta temperatura foi mantida durante todo o tempo de tratamento.

Terminados os tratamentos e uma vez readquirida pelos pedaços de colmos a temperatura ambiente, procedeu-se à repicagem dêles, a-fim-de obterem-se, de cada um, três mudas de uma só gema, mas conservando-se, dentro de cada lote, a separação dos três tipos de mudas: ponta, meio e pé.

O plantio foi feito na mesma data do tratamento, 6-4-43, em vasos de barro com boca de 26 cm de diâmetro e altura de 25 cm, contendo terra esterilizada. Em cada vaso plantaram-se 3 mudas, sempre de um mesmo tipo e provenientes de um mesmo colmo. Os colmos testemunhas, tanto sãos como doentes, foram repicados e plantados sem nenhum tratamento prévio. Os vasos foram conservados embutidos em serragem de madeira, sendo regados diàriamente.

A observação final da experiência realizou-se em 27-7-43, isto é, 4 meses após o seu início.

2) Resultados e discussão

Os principais resultados obtidos com relação à influência do tratamento no "*stand*" de germinação e na incidência da doença, estão condensados na Tabela 12.

Êsses dados revelam que o tratamento favorece o *stand* de germinação, tanto para as mudas de colmos sãos como para as de colmos doentes, correspondendo as diferenças notadas a 5,8% no primeiro caso e 21,7% no segundo.

TABELA 12

Influência do tratamento pela água quente, no *"stand"* de germinação e na doença, em mudas doentes e mudas sãs, plantadas em vasos

Mudas	Colmos doentes		Colmos sãos	
	Tratados	Testa.	Tratados	Tests.
Plantadas	77	43	77	40
Germinadas	56	22	68	33
% germinação	72,7	51,1	88,3	82,5
N.º plantas doentes . . .	48	17	0	0
% plantas doentes . . .	85,7	77,2	0	0

Aliás, foi muito nítida a influência do tratamento na aceleração do processo de germinação: os brotos apontaram sôbre o solo, permitindo a contagem, muito mais cedo, nos vasos cujos toletes tinham sido submetidos ao tratamento, enquanto nos não tratados foi mais tardia a germinação. Tal fato foi observado tanto para o caso das mudas provenientes dos colmos sãos, como para as provenientes dos colmos doentes.

A porcentagem de plantas doentes, determinada no final da experiência, no lote das mudas doentes, tratadas e testemunhas, não revelou nenhum efeito favorável, do tratamento. Pelo contrário, o lote de plantas testemunhas apresentou 7,5% a menos, de plantas com sintomas da doença, que o lote tratado, devido ao aparecimento, provàvelmente ocasional, de dois casos de mascaramento dos sintomas, entre as plantas testemunhas.

Parece, pois, que o tratamento teve efeito exclusivamente sôbre a cana, como já foi verificado por LUKE (20), para esta mesma variedade, porém foi inteiramente ineficiente contra o patógeno. O melhor *stand* de germinação verificado no caso das canas doentes, pelo fato dos brotos terem nascido, foi interpretado como o resultado da aceleração no processo da germinação, permitindo o aparecimento sôbre o solo, de brotos que, nas testemunhas, de germinação mais lenta, morreram antes da emersão.

3) EXPERIÊNCIA DE CAMPO SÔBRE O TRATAMENTO DE MUDAS PELA ÁGUA QUENTE

A origem dos colmos e os tratamentos, nesta experiência, foram justamente os mesmos da anterior. A única diferença, com relação às mudas, foi que, nêste caso, não fizemos a última repicagem dos colmos, porque empregamos mudas de três gemas. Terminado o tratamento, as mudas foram imediatamente plantadas no campo, em linhas de 10 metros de comprimento, com espaçamento de 1,40 m nas entre-

linhas. A distância entre mudas, nas linhas, foi de 1,0 m, que não é a normal, exclusivamente para evitar o contáto das raízes entre plantas vizinhas e para facilitar a observação. Plantaram-se, portanto, 10 mudas em cada sulco. Entre os sulcos, que foram dispostos em duas séries, foi deixado um carreador de 1,50 m de largura. A distribuição dos tratamentos foi feito inteiramente ao acaso. A data de plantio foi 8-4-43.

4) Resultados e discussão

A contagem do *"stand"* de germinação, feita 40 dias após o plantio, deu os resultados expostos na Tabela 13.

TABELA 13

Influência do tratamento pela água quente no *"stand"* de germinação e na doença, para os casos de mudas doentes e mudas sãs, plantadas no campo

Mudas	Colmos doentes		Colmos sãos	
	Tratados	Tests.	Tratados	Tests.
Plantadas	65	63	44	44
Germinadas	4	5	34	37
Falhas	61	58	10	7
% germinação	6,15	7,9	77,2	84,0

Embora não possamos analisar estatìsticamente o grau de significância das diferenças verificadas nos dados da Tabela acima, acreditamos que êsses dados possam exprimir, realmente, certo efeito prejudicial do tratamento, nas condições da experiência, dentro de cada um dos grupos de colmos. Essa diferença é considerada como provàvelmente devida à completa ausência de chuvas nos 20 dias que se seguiram ao plantio. As gemas dos toletes tratados, sendo estimuladas, brotaram imediatamente, morrendo uma parte dos brotos por falta de umidade no solo, ao passo que, nos toletes não tratados, as gemas permaneceram no estado de dormência até que sobreviesse a primeira chuva, quando então germinaram, e os brotos vingaram. Os dados da experiência anterior, revelando um efeito estimulante do tratamento na germinação em condições favoráveis de umidade, corroboram esta hipótese.

Quanto ao efeito na doença, uma vez mais o tratamento se mostrou inteiramente ineficiente, para a variedade C. P. 29/320, nas nossas condições.

RESUMO

O presente trabalho contém os resultados dos estudos de uma doença da cana de açúcar, observada no Estado de São Paulo desde 1937. Esta doença, de início referida como "albinismo da cana", foi identificada como a *"leaf-scald"*, ou "escaldadura das fôlhas", do continente oriental.

A introdução da doença no Estado é considerada realizada no período 1926-1930, em mudas de canas importadas para a restauração da lavoura canavieira, procedendo, provàvelmente, da Austrália.

São apresentadas observações e dados de experiências que nos levam a estimar a "escaldadura das fôlhas" como uma ameaça à nossa lavoura canavieira, principalmente pelo fato de serem as variedades mais suscetíveis, quase tôdas do grupo das canas precoces, indispensáveis nas usinas.

A "escaldadura das fôlhas" é descrita na forma em que se apresenta nas variedades de cana aqui cultivadas, reconhecendo-se a ocorrência tanto da forma aguda como da forma crônica, que é a mais comum, nas nossas condições. São também descritos os sintomas histológicos mais característicos da doença.

E' feita uma descrição do patógeno que, quanto ao aspecto em cultura e aos caracteres morfológicos e fisiológicos, se considera idêntico à *Phytomonas albilineans* ASHBY, agente da "escaldadura das fôlhas" no Oriente. O patógeno é fàcilmente isolável em cultura pura, usando-se o meio líquido de caldo de cana e peptona, para plantação de tecidos, e o meio de sacarose e peptona, de WILBRINK, para a semeadura em placas.

São apresentados os resultados de experiências de inoculação artificial, nas quais se empregaram culturas puras de quatro diferentes isolamentos. Todos êstes isolamentos se mostraram patogênicos para a variedade Co. 290, sendo o organismo reisolado em cultura pura, que se mostrou patogênica quando em novas inoculações.

A disseminação da "escaldadura das fôlhas" nas nossas condições é considerada como tendo sido rápida para algumas variedades. A propagação de mudas doentes e a infecção mecânica pelo facão, empregado no corte da cana, são apresentados como os dois principais meios de disseminação. Não há evidências da ocorrência de infecção secundária nos nossos canaviais, embora não se abandone a hipótese da existência de algum inseto vetor. O caráter infeccioso, do suco de plantas com a doença na forma latente, é demonstrado por meio de inoculações dêsse suco em plantas sãs, pelo processo de puncções com micro-alfinete.

São apresentadas observações em abono da hipótese de que nossas condições de solo e clima não são desfavoráveis ao desenvolvimento da "escaldadura das fôlhas".

Resultados de experiências de inoculação artificial, bem como observações de campo para o estudo da resistência à doença de 13 variedades de cana, são apresentados. Do ponto de vista comercial, são consideradas como mais resistentes as variedades Co. 290 e C. P. 27/139. As mais suscetíveis são a Co. 281 e suas descendentes americanas, C. P. 28/11, 28/19 e 29/320. A cana Co. 281, nas nossas condições, é um tipo indesejável para cruzamentos, por ser transmissôra do caráter suscetibilidade. O atual bom estado de sanidade da variedade P. O. J. 213, com relação à doença, nas nossas condições é interpretado como devido à falta das mesmas oportunidades de infecção que tiveram as outras variedades súscetíveis, e não como conseqüência de uma maior resistência daquela variedade.

A seleção de mudas e prática do *"roguing"*, em viveiros especiais, são medidas apresentadas como indispensáveis para o contrôle da doença e conservação das atuais variedades. Novas medidas são sugeridas para o contrôle dos viveiros, visando a localização dos casos de latência, tidos como o maior entrave para o sucesso destas práticas de contrôle em nosso meio.

O tratamento de toletes doentes pela água quente, algures preconizado, não é aconselhável, tendo dado resultados inteiramente negativos nas experiências que realizámos.

LEAF SCALD A DISEASE OF SUGAR CANE NEW TO BRAZIL

Abstract

This paper contains the results of studies on a disease of sugar cane that has been observed in our sugar cane plantations since 1937. This disease was first called "albinismo da cana". Is is now considered identical with leaf scald, a bacterial-vascular disease of sugar cane in the Eastern Hemisphere.

It is considered that the disease was introduced in the State of S. Paulo probably from Australia, in the period 1926-1930, in some sugar cane varieties that were imported at the time of the epiphytotic of mosaic disease in this country.

The disease is considered as a very serious one here principally because all the varieties of the early maturing group in this State seem to be the most susceptible. Field observations and experimental results are presented corroborating this opinion.

A description is made of the morphological and histological symptoms of the disease as they are observed on the commercial varieties. Both the chronic and the acute forms of the disease are described, but the chronic form is considered the most prevalent in the sugar cane plantations.

The bacterial pathogen occurring here is considered identical to Phytomonas albilineans ASHBY, *the causal agent of leaf scald in the Eastern Hemisphere, in respect to the morphological, physiological and cultural characters. The best results for the isolation of the organism in pure culture have been obtained by using North's sugar cane juice and peptone liquid medium for tissue plantings and Wilbrink's sucrose and peptone-agar for dilution plates.*

The results of experiments of artifical inoculation of Co. 290 cane are presented for four cultures of different origins.

All these cultures showed to be pathogenic to sugar cane and the pathogen was recovered in pure culture. The pathogenicity of this culture was tested with positive results.

The dissemination of the disease is considered as rapid in some varieties. The principal means of dissemination of the disease are considered to be diseased seed pieces and knife infection. There are no evidences of secundary infection occuring here. The possibility of the existence of an insect vector, however, is not discarded. The infectious nature of the juice extracted from young leaves and the spindle of cane with the disease in its latent form has been demonstrated through experimental inoculation. Matz's micropin method, devised for mechanical transmission of mosaic disease of sugar cane was used.

Field observations are given in favor of the hypothesis that the conditions of soil and climate prevailing here are favorable for the development of the disease.

Experimental results and field observations are presented regarding the susceptibility to the disease of 13 sugar cane varieties. From the commercial viewpoint Co. 290 and C. P. 27/139 are considered as the most resistant varieties. Co. 281 and its American seedlings C. P. 28/11, C. P. 28/19 and C. P. 29/320 are the most susceptible canes. The P. O. J. 213 cane apparently a susceptible variety, seems to have escaped infection.

Seed-cane selection and roguing of diseased stools, especially in nurseries for seed-cane production are advocated as necessary measures of control for the conservation of commercial and susceptible varieties. New methods to localize the diseased stools, in a latent stage in the field, are suggested.

Hot water treatment of the stalks (20 minutes at 52° C.) which has been suggested for the control of leaf scald, has given negative results in our experiments.

BIBLIOGRAFIA

1 — Aguirre Jr., J. M., H. C. Arruda & A. J. Rodriguez — 1939 — A preliminary note on the field experimentation of the Cane Sugar Section (Instituto Agronomico de São Paulo, Brazil). *Int. Soc. Sug. Cane Tech., Proc. 6th Cong.*, Baton Rouge, La., pp. 673-679.

2 — Arruda, S. C. & J. Franco do Amaral — 1944 — Leaf scald of sugar cane in Brazil. *Phytopathology*, (no prelo).

3 — Ashby, S. F. — 1930 — Gumming disease of sugar cane. *Trop. Agric.*, 6: 135-138.

4 — Baissac, J. — 1936 — Disease and pests of the sugar cane in Nossi Bé, Madagascar. *Int. Sug. Journ.*, 38: 130-132.

5 — Bell, A. F. — 1929 — The distribution of sugar cane diseases. *Ref. Book Sug. Indus. of the World*, 7: 31-32.

6 — Bell, A. F. — 1932 — Work of the Division of Pathology. *Thirty-second Ann. Rept. Qd. Bur. Sug. Exp. Stas.*, pp. 46-50. (Sum. *Rev. Appl. Myc.*, 12: 245. 1933).

7 — Bell, A. F. — 1934 — Report of the Division of Entomology and Pathology. *Thirty-fourth Ann. Rept. Qd. Bur. Sug. Exp. Stas.*, pp. 50-72. (Sum. *Rev. Appl. Myc.*, 14: 332-333. 1935).

8 — Bell, A. F. — 1935 — Two inoculation methods. *Int. Soc. Sug. Cane Tech., Proc. 5th Cong.*, Brisbane. pp. 199-201.

9 — Bell, A. F. — 1935 — Disease resistance trials in Queensland. *Int. Soc. Sug. Cane Tech., Proc. 5th Cong.*, Brisbane, pp. 511-517.

10 — Bell, A. F. — 1937 — Report of the Division of Entomology and Pathology. *Rept. Qd. Bur, Exp. Stas.*, 1936-1937, pp. 34-41. (Sum. *Rev. Appl. Myc.*, 17: 66-67. 1938).

11 — Bell, A. F. — 1939 — Report of the Division of Entomology and Pathology. *Rept. Qd. Bur. Sug. Exp. Stas.*, 1938-1939, pp. 45-59. (Sum. *Rev. Appl., Myc.*, 19: 236-237. 1940).

12 — Bell, A. F. — 1941 — Report of the Division of Entomology and Pathology, *Rept. Qd. Bur. Sug. Exp. Stas.*, 1940-1941, pp. 19-23. (Sum. *Rev. Appl. Myc.*, 21: 303-305. 1942).

13 — Bell, A. F. — 1942 — Report of the Division of Entomology and Pathology. *Forty-second Ann. Rept. Qd. Bur. Sug. Exp. Stas.*, pp. 12-13.

14 — Cottrell-Dormer, W. — 1925 — Cane pests and diseases. *Qd. Agr. Journ.* 24: 441-443. (Sum. *Rev. Appl. Myc.*, 5: 327-328. 1926).

15 — Cottrell-Dormer, W. — 1925 — Cane pests and diseases. *Qd. Agr. Journ.*, 24: 518. (Sum. *Rev. Appl. Myc.*, 5: 328. 1926).

16 — Dowson, W. J. — 1943 — On the generic names Pseudomonas, Xanthomonas and Bacterium for certain bacterial plant pathogens. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 26: 4-14.

17 — Groenewege, J. — 1915 — De Gomziekte van het Suikerriet veroorzaakt door Bacterium vascularum Cobb. *Arch. Suikerindus. Ned. Indie*, 23: 29-124.

18 — Lee, H. A. — 1922 — Observations on previously unreported or noteworthy plant diseases in the Philippines. *Philipp. Agr. Rev.* 14: 422-434. (Sum. *Rev. Appl. Myc.*, 2: 108-109. 1923).

19 — Lee, H. A. — 1923 — Gum disease of sugar cane in the Philippines. *Phytopath.*, 13: 504.

20 — Luke, W. J. — 1942 — The hot water treatment of sugar cane. A report of progress. Rept. on cooperative tests with the hot water treatment of sugar cane. *Louisiana Bull.*, 336.

21 — Martin, J. P. — 1938 — Sugar cane diseases in Hawaii. Honolulu, Hawaii, pp. XIV + 295, ilustrado.

22 — Martin, J. P. — 1938 — Pathology. *Rept. Hawaiian Sug. Exp. Sta.*, 1937: 28-34. (Sum. *Rev. Appl. Myc.*, 17: 487. 1938).

23 — Martin, J. P. — 1942 — Pathology. *Rept. Hawaiian Sug. Exp. Sta.*, 1941: 28-42. (Sum. *Rev. Appl. Myc.*, 21: 349-350, 1942).

24 — Martin, J. P. — 1943 — Pathology. *Rept. Hawaiian Sug. Exp. Sta.*, 1941: 23-36. (Sum. *Rev. Appl. Myc.*, 22: 343-344. 1943).

25 — Martin, J. P., C. W. Carpenter & D. M. Weller — 1932 — Leaf scald disease of sugar cane in Hawaii. *The Hawaiian Planters' Rec.*, 36: 145-196.

26 — North, D. S. — 1925 — Leaf scald a bacterial disease of sugar cane. *Colonial Sugar Refining Co. Ltd. Agr. Rept. 8* (Technical). Sydney, N. S. W.

27 — North, D. S. — 1929 — Leaf scald disease of sugar cane and its control. *Colonial Sugar Refining Co. Ltd. Agr. Rept. 9*, Sydney, N. S. W.

28 — North, D. S. — 1930 — The bacterial vascular disease of sugar cane. *Int. Soc. Sug. Cane. Tech. Proc. 3rd. Cong.*, Soerabaia, India, pp. 142-146.

29 — North, D. S. & H. A. Lee — 1924 — Java gum disease identical to leaf scald of Australia. *Phytopath.*, 14: 97.

30 — Orian, G. — 1932 — Botanical Division Ann. Rept. Mauritius Dept. of Agric. for the year 1930: 10-13. (Sum. *Rev. Appl. Myc.*, 11: 495-496. 1932).

31 — Shepherd, E. F. S. — 1930 — Botanical Division, Ann. Rept. Mauritius Dept. Agric. for 1928: 10-13. (Sum. *Rev. Appl. Myc.*, 9: 507. 1930).

32 —Shepherd, E F. S. — 1932 — Botanical Division, Ann. Rept. Mauritius Dept. Agric. for 1931: 12-15. (Sum. *Rev. Appl. Myc.*, 12: 553-554. 1933).

33 — Society of American Bacteriologists — 1934 — Pure culture study bacteria, Staining procedures, 5.ª ed., IV, 34,-3 a IV, 34,-24.

34 — Tempany, H. — 1928 — Agriculture in Mauritius. *Trop. Agric.*, 5: 227.

35 — Vizioli, José — 1927 — A importação de mudas de cana e um processo para a sua rápida multiplicação. Secret. Agr. Indus. Comércio., *Bol. Agricultura*, S. Paulo, (Ser. 10), 28, pp. 634-643.

36 — Wilbrink, G. — 1920 — De Gomziekte van het Suikerriet, hare Oorzaak en hare Bestrijding. *Arch. Suikerindus. Ned. Indie*, 28: 1389-1525.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Estampa 11

Fig. *A* — Plantinha da variedade C. P. 29/320 mostrando as estrias cloróticas típicas da doença no limbo, na nervura principal e na bainha da fôlha.

Fig. *B* — Duas canas doentes provenientes de gemas diferentes de um mesmo colmo: *a* — planta de porte sub-normal, com internódios curtos e fôlhas albinas; *b* — planta de aparência normal, cujo único sintoma da doença consiste numa leve estria clorótica de uma das fôlhas.

Estampa 12

Fig. *C* — Três vasos com plantinhas da variedade C. P. 28/19, sendo as duas da esquerda inoculadas e a da direita testemunha. Das inoculadas uma apresenta albinismo parcial e a outra albinismo total das fôlhas.

Fig. *D* — Plantinha testemunha, à esquerda, da variedade P. O. J. 2878, e três outras inoculadas, da mesma variedade. Nestas, notar o albinismo parcial das fôlhas e a deformação do broto.

Estampa 13

Fig. *E* — Aspecto interno de três pedaços de colmos doentes mostrando a descoloração dos feixes fibrovasculares, na variedade C. P. 29/320. No da direita, notar a extenção da cavidade formada pela destruição do parênquima da medula.

Estampa 14

Fig. *F* — Parte de um colmo da variedade Co. 290, no qual se observa a brotação total das gemas laterais, que ocorre nas canas doentes no campo.

Fig. *G* — Secção transversal de um feixe fibrovascular descolorido, no colmo da variedade C. P. 29/320. Notar a abundância de goma ocupando o lumen dos vasos do metaxilema e a cavidade da região do protoxilema, bem como o aparente início de necrose do floema, com origem no protofloema, x 300.

Fig. *H* — Secção transversal de um feixe fibrovascular do tipo grande. localizado na nervura principal da fôlha, onde havia uma estria velha. Notar a completa desintegração dos elementos do protoxilema e floema, x 300.

Fig. *I* — Aparelho inoculador usado em algumas das experiências.

Estampa 15

Fig. *J* — Dois grupos de 5 linhas com 6 vasos cada uma, representando, à direita, a variedade C. P. 28/19, e à esquerda, a variedade C. P. 28/11. Em cada grupo, as cinco linhas da direita são de plantas inoculadas e a linha da esquerda, de plantas testemunhas.

Fig. *K* — Dois vasos com plantas inoculadas, à esquerda, e um com uma planta testemunha, à direita, da variedade Co. 290. Nesta variedade resistente, as plantas inoculadas, de porte aparentemente normal, apresentam apenas as estrias das fôlhas.

A

B

Vol. 15 — Art. 12 Dezembro de 1944

O "REPASSE" COMO MÉTODO DE CONTROLE DA BROCA DO CAFÉ "HYPOTHENEMUS HAMPEI (FERR., 1867)" (COL. IPIDAE)

POR

J. Bergamin

Do Instituto Biológico de S. Paulo

Com 2 figuras no texto

INTRODUÇÃO

No presente trabalho são dados a conhecer os resultados de duas experiências preliminares, destinadas a pôr em evidência o valor do repasse no combate à broca do café, *H. hampei*. Os planos foram organizados de forma que pudéssemos apreciar os resultados com o auxílio da análise estatística, o que só foi possível depois de ficarem mais bem conhecidos certos hábitos da praga. Ao Dr. A. A. BITANCOURT agradecemos as sugestões e a orientação para a análise de variance dêste trabalho.

A broca não se reproduz fora do café. Ainda que experimentalmente ela possa viver muitos dias no interior de grãos diversos, fragmentos de plantas várias, ela jamais efetua posturas nesses meios. O período de vida nessas condições, contudo, jamais permitiria que as fêmeas alcançassem os frutos novos da safra seguinte àquela em cujos grãos evoluiram. Só na semente do café encontra a broca ambiente capaz de prolongar-lhe a vida de uma safra a outra, ou de permitir-lhe a postura.

Nas condições do Estado de S. Paulo, o ataque normal da broca aos frutos novos tem início em Dezembro-Janeiro. Desde os frutos verdes, ainda aquosos, até os quase sêcos, podem ser perfurados. A semente bem granada, com certa resistência (de Janeiro em diante) já permite a evolução de larvas. Normalmente a colheita tem início em Maio, prolongando-se até Agôsto. Em ano de safra muito grande, pode estender-se até Outubro. As temperaturas, durante os meses de Janeiro a Maio, são favoráveis a um rápido desenvolvimento do inseto, e quatro gerações se completam nesse período (2). Depois da colheita, parte da população da broca é destruida com a seca do café, e parte passa a viver nos frutos que permanecem nos cafezais, tanto nos das árvores como nos de chão. Sendo a vida média da broca de 156 dias (máxima observada: 282 dias) (2), não é necessária a procreação durante o período de entre safras, para que muitas fêmeas

atinjam a nova frutificação. Havendo umidade, porém, a procreação não cessa e a população pode crescer até um limite determinado pela maior ou menor quantidade de frutos à sua disposição. A infestação de uma fazenda é, até certo ponto, função inversa do esmêro e do capricho do fazendeiro. Compreende-se, por outro lado, que êsse esmêro e êsse capricho dependem ìntimamente do fator econômico, decorrente do maior ou menor valor do produto.

O repasse, que vem sendo aconselhado desde 1924 (1, 3, 4, 5 e 6), é a operação destinada a eliminar da lavoura, depois da colheita, todo o café deixado, tanto nas árvores como no chão. Seu fim principal é destruir qualquer possibilidade de vida, ou pelo menos tornar o meio inadequado à vida da broca. Destruindo seus abrigos e eliminando os focos de permanência durante o tempo em que a broca é inativa, creamos tal ordem de dificuldades ao inseto, que só no final da colheita do ano seguinte a sua população é capaz de tornar-se perceptível. O período de entre safras é pois a melhor época para combatê-la com segurança, porque toda a população existente se concentra no café deixado na lavoura.

MATERIAIS E MÉTODOS

EXPERIÊNCIA PRELIMINAR DE 1942-1943

Afim de tornar possível qualquer apreciação, no mesmo ano, do mérito do repasse como método de combate à broca, elaborámos um plano de experiência, que foi iniciado em Setembro de 1942.

Num talhão de cafeeiros da Fazenda Santana, no município de Campinas, escolhemos e marcámos um quadrado de 20 x 20 plantas, que foi dividido em 16 lotes de 25 plantas cada um. Os tratamentos feitos foram: T — testemunha; A — repasse só nas árvores; C — repasse só no chão e AC — repasse completo nas árvores e no chão. Cada tratamento foi feito com 4 repetições (fig. 1). A colheita normal dêsse talhão foi terminada na primeira quinzena de agôsto dêsse ano.

Em princípio de Setembro de 1942 foi iniciada a experiência. Nessa época não havia ainda vestígios de florada, o que facilitou o andamento dos trabalhos, pois o repasse deve ser feito antes que os cafeeiros se apresentem cobertos de botões ou flores, para não se derrubar grande parte dêles.

A marcha dos trabalhos obedeceu ao seguinte critério:

T — Os lotes testemunhas permaneceram como estavam depois da colheita normal.

A — A retirada dos frutos das árvores foi feita com cuidado, a dedo. Os frutos presos nas forquilhas, nos ninhos de pássaros ou entre os troncos, foram também retirados.

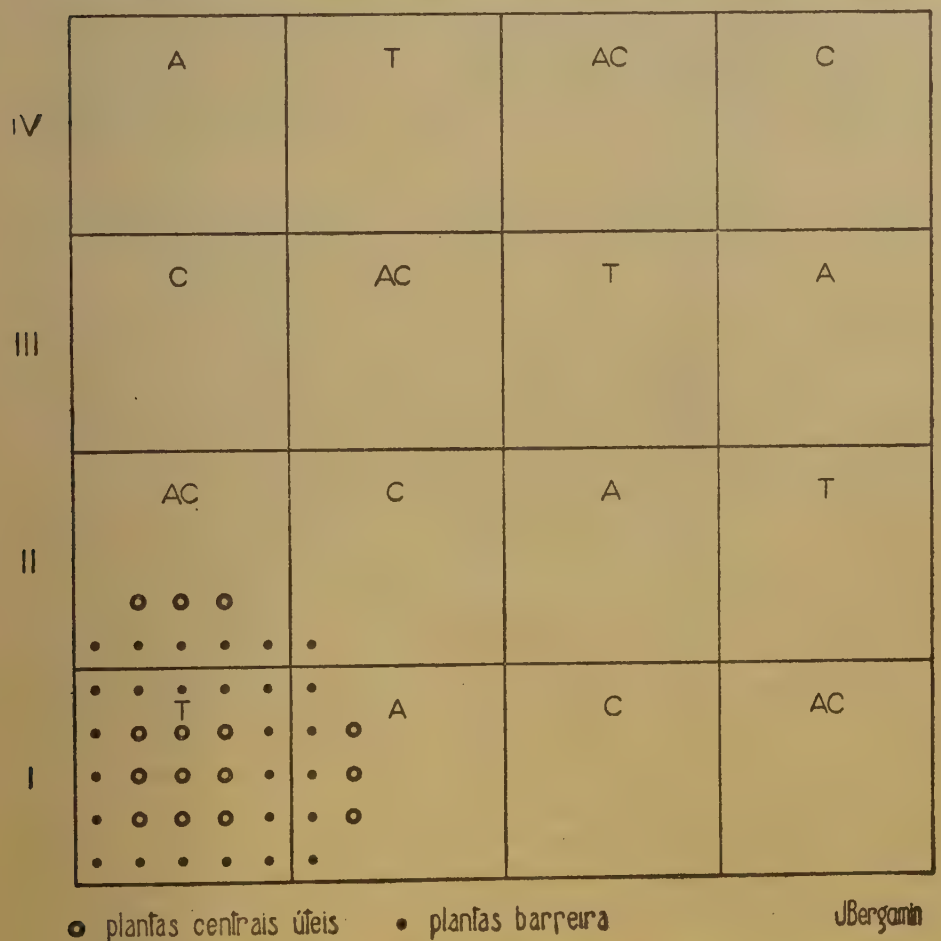


Fig. 1 — Planta do campo da experiência preliminar, realizada em 1942-43 e 1943-44.

C — O chão foi rastelado e varrido e os frutos foram recolhidos, sem se tocar nos das árvores.

AC — Os frutos existentes nas árvores, nas forquilhas, nos ninhos e entre os troncos foram derrubados; o chão foi rastelado e varrido; foi feita a peneiragem e a abanação de todo o café; depois de limpo, foi transportado para o laboratório e medido.

Nenhum outro repasse foi feito. Os frutos que no curso dessas operações estavam enterrados nos cordões da coroação, permaneceram nos lotes, mesmo depois de esparramados êsses cordões.

Tomada de amostras e cálculo da infestação — Em junho de 1943, alguns dias depois de começada a safra normal, iniciámos a colheita de café da nossa experiência. De cada lote só foram consideradas úteis, para efeito da tomada de amostras, as 9 plantas centrais, ficando, portanto, entre os tratamentos, uma barreira de duas linhas de cafeeiros (fig. 1). Procurámos com isso

evitar ou atenuar a influência de um tratamento sôbre outro. Das 9 plantas consideradas em cada lote, foram escolhidas 4 ao acaso, para a retirada das amostras. Foi feita a colheita separada das 4 plantas de cada lote e depois que todos os frutos foram bem misturados, tomámos uma amostra de 1000 cc. do volume total de cada planta. Tôdas as amostras foram examinadas, tendo sido separados os frutos broqueados dos não broqueados, para o cálculo da porcentagem de infestação, de acôrdo com a fórmula: $(\frac{b}{b+i} \times 100)$, onde b é o número de frutos broqueados e i o número de frutos indenes ou não broqueados.

Os dados, em porcentagem de frutos furados pela broca, constituem a tabela 1.

EXPERIÊNCIAS DE 1943-1944

A) No mesmo campo experimental.

No mesmo talhão e seguindo o mesmo critério, foram feitos os repasses em Agôsto de 1943. A distribuição dos lotes foi a mesma estabelecida em 1942. Os tratamentos foram feitos, portanto, pela segunda vez nas mesmas plantas.

Tomada de amostras e cálculo de infestação — Como em 1943, procedemos à colheita dos frutos. Ao invés de 4, como em 1943, 7 foram as plantas escolhidas ao acaso dentre as 9 que constituem a parte central de cada tratamento. Depois da homogeneização do volume total de frutos de cada planta, foi tomada a amostra de 1000 cc. e calculada a porcentagem de frutos atacados (tabela 3).

B) Em outro campo experimental.

Em vista dos animadores resultados do ensaio preliminar de 1942-1943, que, segundo revela a análise de variance (tabela 2), permitiu-nos a comparação entre os tratamentos, no mesmo ano, resolvemos realizar, em 1943, uma experiência suplementar mais ampla, com os mesmos tratamentos, aplicados em maior número de plantas e repetidos mais vêzes.

Escolhemos, para essa experiência, um talhão de semi-encosta, um pouco abaixo do primeiro, com plantas mais bem conformadas, maiores e mais produtivas (fig. 2). O repasse, nessas condições, seria mais difícil, devido ao tamanho das árvores.

Os tratamentos foram os mesmos: T, A, C, e AC. Êsses quatro lotes foram distribuidos ao acaso, em seis repetições, havendo 4 x 10 cafeeiros em cada lote, constituindo-se toda a experiência de 960 plantas.

Também neste campo só foi feito o repasse uma vez. Os frutos semi-enterrados e ocultos pela "coroação" permaneceram na cultura.

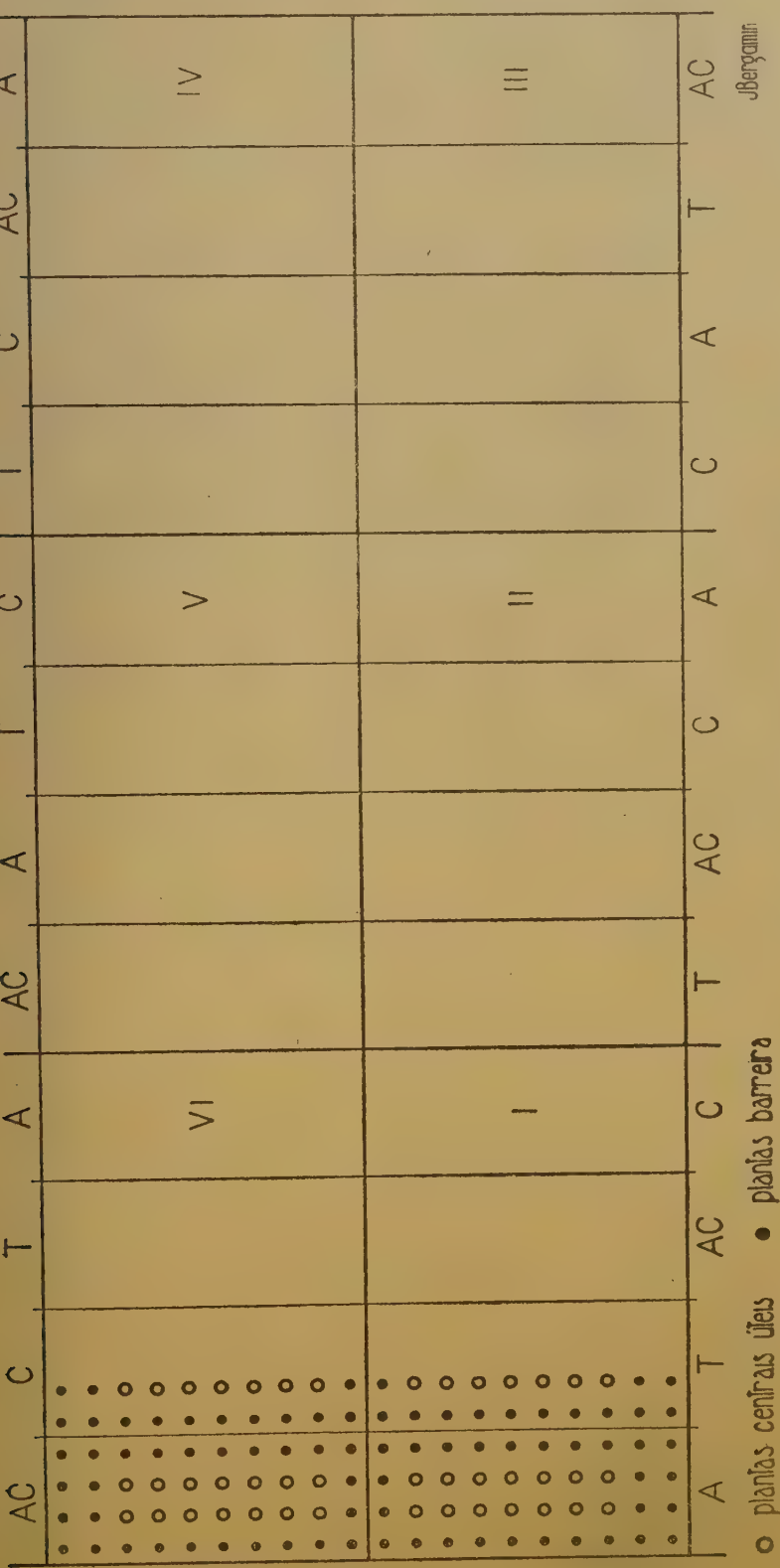


Fig. 2 — Planta do campo da experiência suplementar, realizada em 1943-44.

Tomada de amostras e cálculo da infestação — Diante dos resultados anteriores, não foram separadas as amostras por planta, mas foi tomada uma só amostra de 1000 cc. de cada lote. Depois da colheita das 14 plantas centrais de cada lote, foram os frutos amontoados e bem revolvidos para a homogeneização, sendo então tirada a amostra. Os dados da tabela 5 representam, pois, a porcentagem média de cada lote.

RESULTADOS

Para procedermos às análises de variance das experiências, foi necessário transformar os dados, que são expressos em porcentagens, no arcseno de sua raiz quadrada (7).

TABELA 1

Dados em porcentagem, das amostras tomadas em 1943, representando a infestação média de cada planta

Repetições	Plantas	Tratamentos			
		T	A	C	AC
I	1	11,5	10,4	16,9	9,7
	2	28,9	3,8	16,7	2,8
	3	12,4	2,6	20,4	4,4
	4	23,1	2,6	21,4	8,5
II	1	18,9	9,1	6,1	2,9
	2	65,6	11,7	1,8	2,4
	3	25,1	2,2	2,2	5,3
	4	10,5	6,5	1,5	3,4
III	1	47,0	21,9	2,7	1,6
	2	29,6	10,9	10,6	0,9
	3	8,8	12,0	4,9	14,5
	4	33,4	10,7	16,0	2,3
I V	1	14,0	3,3	7,1	4,7
	2	11,6	4,9	9,6	8,5
	3	4,4	12,1	14,2	1,2
	4	7,1	5,6	22,5	2,9

TABELA 2

Análise de variance dos dados da tabela 1, transformados no arceno da raiz quadrada da porcentagem

Fonte de variação	G. L.	Soma dos quadrados	Variance
Total	63	5.368,1507	
Plantas	3	81,0156	27,00
Repetições	3	193,2300	64,41
Tratamentos	3	1.926,7796	642,26**
Plantas x repetições	9	213,0751	23,67
Plantas x tratamentos	9	531,2736	59,03
Repetições x tratamentos	9	1.217,7510	135.30*
Pl. x rep. x trat.	27	1.205,0258	44,63

TABELA 3

Dados em porcentagem, das amostras tomadas em 1944 no mesmo campo de 1943, representando a infestação média de cada planta

Repetições	Plantas	Tratamentos			
		T	A	C	AC
I	1	7,0	3,3	13,2	3,7
	2	21,2	8,0	11,7	5,7
	3	16,8	7,1	18,8	7,3
	4	49,4	9,5	6,3	6,9
	5	41,5	7,5	23,7	6,3
	6	21,8	42,1	11,7	12,1
	7	17,2	9,9	17,5	7,6
II	1	24,5	4,4	3,8	4,8
	2	22,5	7,0	6,5	4,4
	3	51,6	11,8	4,2	5,6
	4	40,7	5,5	3,5	1,0
	5	25,2	4,9	1,0	4,0
	6	41,2	11,2	12,9	0,6
	7	37,9	16,0	3,8	4,2
III	1	3,0	34,5	21,7	8,2
	2	17,4	14,3	6,5	2,4
	3	21,9	2,8	13,7	3,6
	4	12,0	5,9	16,8	2,8
	5	4,9	9,7	17,4	8,4
	6	15,2	33,1	9,7	6,7
	7	20,6	32,0	27,4	7,1
IV	1	14,1	10,7	9,1	2,5
	2	13,3	9,1	31,8	8,7
	3	13,8	8,4	25,4	4,4
	4	24,1	4,8	22,0	8,9
	5	21,5	4,4	9,4	10,1
	6	7,8	7,3	12,3	9,3
	7	4,7	7,0	27,8	8,9

** Altamente significante.
* Apenas significante.

TABELA 4

Análise de variance dos dados da tabela 3, transformados no arcseno da raiz quadrada da porcentagem

Fonte de variação	G. L.	Soma dos quadrados	Variance
Total	111	8.558,9726	
Plantas	6	253,8222	42,30
Repetições	3	106,0208	35,34
Tratamentos	3	2.509,4346	836,48**
Plantas x repetições	18	810,7093	45,04
Plantas x tratamentos	18	925,5036	51,42
Repetições x tratamentos	9	2.119,7802	235,53**
Pl. x rep. x trat.	54	1.833,7019	33,96

TABELA 5

Dados em porcentagem, da experiência suplementar, no talhão de semi-encosta, (Fig. 2) representando a infestação média de cada lote

Repetições	Tratamentos			
	T	A	C	AC
I	17,2	18,7	12,1	4,7
II	13,7	8,5	4,2	7,3
III	11,1	2,0	1,2	1,5
IV	6,4	1,8	6,5	4,6
V	14,4	7,8	10,5	7,9
VI	10,6	8,0	6,6	6,8

TABELA 6

Análise de variance dos dados da tabela 5, transformados no arcseno da raiz quadrada da porcentagem

Fonte de variação	G. L.	Soma dos quadrados	Variance
Total	23	638,9704	
Repetições	5	300,1890	60,04**
Tratamentos	3	173,5490	57,85**
Resíduo	15	165,2324	11,01

** Altamente significante.

DISCUSSÃO

Como se depreende dos resultados obtidos em 1943 e 1944, no primeiro de nossos campos, e em 1944, no segundo, o repasse foi mais eficiente quando completo (AC). No primeiro campo, nos dois anos, os resultados foram melhores em A do que em C. Isso se deve à conformação das plantas, que em virtude da sêca não abrigaram bem dos raios solares os frutos deixados no solo, no tratamento A. Na experiência suplementar de 1943-1944, o repasse só dos frutos do solo (C) deu melhor resultado, pois as plantas, nesse campo, mais bem conformadas e mais enfolhadas do que no primeiro, abrigaram melhor os frutos caidos dos lotes A, do que os frutos pendentes dos lotes C. Estabelecendo-se a diferença de médias (tabelas 7, 8 e 9) podemos verificar que, no primeiro campo, só houve diferença altamente significante entre T e AC, nos dois anos, enquanto houve diferença apenas significante entre T e A, apenas no primeiro ano. Essa diferença, contudo, não é suficiente para recomendar êste último tratamento. Em cafezal econômicamente produtivo, como o que utilizámos em nossa segunda experiência, os frutos de chão oferecem maior perigo como focos e abrigos de broca, por serem as plantas maiores e mais enfolhadas. A diferença entre médias, para essa experiência, indica que o repasse incompleto C pode dar bom resultado no combate à broca. Apesar de havermos encontrado diferença altamente significante entre T e C, repasse êste mais simples e menos demorado, o tratamento AC (repasse completo na árvore e no chão) mais se recomenda, pois a diferença entre T e AC, também altamente significante, é maior do que qualquer outra.

TABELA 7

Médias dos tratamentos (em arcseno da $\sqrt{\%}$), de 1942-1943 e significância das diferenças

	Média	D_{05} + 9,68	D_{99} + 13,07	AC	C	A	T
T	26,80			* *	—	*	
A	15,83	25,51		—	—		
C	18,07	27,75		—			
AC	11,80	21,48	24,87				

Diferenças significantes: $D_{05} = 9,68$ (0,05)
$D_{99} = 13,07$ (0,01)

** Altamente significante.
* Apenas significante.

O repasse só dos frutos do chão talvez possa ser completado pela distribuição da vespa de Uganda *Prorops nasuta* WATERST. após a sua execução, pois observações feitas por TOLEDO (8) revelam que a vespa só combate a broca nos frutos pendentes.

TABELA 8

Médias dos tratamentos (em arcseno da $\sqrt{\%}$), de 1943-1944 e significância das diferenças

	Média	D_{95} + 8,28	D_{99} + 11,04	AC	C	A	T
T	26,86			* *	—	—	
A	18,96	27,24		—	—		
C	20,90	29,18		—			
AC	13,62	21,90	24,66				

Diferenças significantes: $D_{95} = 8{,}28$ (0,05)
$D_{99} = 11{,}04$ (0,01)

TABELA 9

Médias dos tratamentos (em arcseno da $\sqrt{\%}$), da experiência suplementar de 1943-1944 e significância das diferenças

	Média	D_{95} + 4,05	D_{99} + 5,60	AC	C	A	T
T	20,27			* *	* *	*	
A	15,18	19,23	20,78	—	—		
C	14,51	18,56	20,11	—			
AC	13,18	17,23	18,78				

Diferenças significantes: $D_{95} = 4{,}05$ (0,05)
$D_{99} = 5{,}60$ (0,01)

Além das diferenças entre médias, ressalta o fato de que só o tratamento AC manteve baixa a infestação média (Tabelas 7, 8 e 9). Êsse fato, evidente nos dois campos experimentais, talvez sirva para recomendar o repasse completo, tão perfeito quanto possível, como método de contrôle à broca, pois êle restringe as possibilidades de reprodução e de permanência do inseto durante os meses críticos de sua vida.

Pelas análises de variance podemos verificar que houve interação significante r e p e t i ç õ e s x t r a t a m e n t o s, em 1943 e altamente significante em 1944. Um ligeiro exame dos dados (tabe-

** Altamente significante.
* Apenas significante.

las 1 e 3) mostra que essa interação foi ocasionada principalmente pelo tratamento T (lotes nos quais a broca permaneceu e agiu naturalmente) nas repetições II e III em 1943 e na repetição II em 1944.

Procurando, no campo, a causa da interação, julgamos tê-la encontrado no melhor aspecto dos cafeeiros dos lotes T, nas repetições II e III, o que proporcionou melhor abrigo à broca no intervalo das safras.

CONCLUSÕES

Do que foi exposto e discutido, podem ser tiradas as seguintes conclusões:

1) O tratamento A (repasse só nas árvores), deu melhor resultado do que o tratamento C (repasse só no chão), no campo experimental de plantas decadentes e desfolhadas pela sêca, em 1942-43 e 1943-44.

2) O tratamento C deu melhor resultado do que o tratamento A, no campo experimental de plantas econômicamente produtivas, em 1943-44.

3) O tratamento AC (repasse completo na árvore e no chão), deu melhor resultado do que A e C, nos dois campos experimentais, em 1942-43 e 1943-44.

THE "REPASSE" AS CONTROL MEASURE FOR THE COFFEE BERRY BORER "*HYPOTHENEMUS HAMPEI* (FERR., 1867)" (COL. IPIDAE)

Abstract

In this paper are presented and discussed the results of preliminary experiments on the control of the coffee berry borer (H. hampei). *The purpose of these experiments was to valuate the efficiency of the so called "repasse", that is a control measure consisting in the elimination of those fruits that are left on the trees after the crop has been picked.*

Two experiments are presented, one covering two years and the other only one year. In both experiments the results obtained with three different kinds of "repasse" are compared statistically to those of the check or untreated plots. These three kinds of "repasse" were: A) "repasse" of the fruits left on the tree only; C) "repasse" of the fruit left on the ground under the tree, leaving those on the trees; AC) complete "repasse", picking up the fruits from the ground and also from the trees.

The analysis of variance of the results showed highly significant differences for treatment AC in both experiments and for treatment C in the second experiment as compared with the check plants.

The highly significant difference in treatment C seems to be due to the fact that the remaining fruits on the ground that were picked up during the "repasse" offer good conditions for the overwintering of the insect and their elimination brought down the population of the insect. The fruits on the tree in treatment A did not offer such a good condition and trees C itself did not show significant control.

BIBLIOGRAFIA

1 — Andrade, E. Navarro de, A. Neiva e A. da Costa Lima — 1924 — Relatório da Comissão Técnica sôbre a broca do café (S. coffeae Hag.). *Serv. de Defesa do Café.* S. Paulo. Publ. 1, 11 pp.

2 — Bergamin, J. — 1943 — Contribuição para o conhecimento da broca do café "Hypothenemus hampei (Ferrari, 1867)" (Col. Ipidae). *Arquivos do Inst. Biol.*, S. Paulo, 14: 31-72.

3 — Fonseca, J. Pinto da, e M. Autuori — 1932 — Principais pragas do café no Est. de S. Paulo, *Secr. Agr. S. Paulo*, 87 pp., 40 figs., 8 est.

4 — Neiva, A., E. Navarro de Andrade e A. Queiroz Telles — 1925 — Instruções para o combate à broca do café, Stephanoderes hampei (Ferr. 1867). *Com. Est. e Deb.*, S. Paulo. Publ. 3, 11 pp., 7 est., 1 mapa.

5 — Oliveira Filho, M. L. de, — 1927 — Contribuição para o conhecimento da broca do café no Estado de S. Paulo. *Com. Est. e Deb.*, S. Paulo. Publ. 20, 95 pp., 44 est.

6 — Rodovalho, B. T. — 1925 — O repasse e seus resultados. *Com. Est. e Deb.*, S. Paulo. Publ. 9, 32 pp.

7 — Snedecor, G. W. — 1940 — Statistical Methods Applied to Experiments in Agriculture and Biology. *The Iowa State College Press.* Ames, Iowa 422 pp.

8— Toledo, A. A. de, — 1942 — Notas sôbre a biologia da vespa de Uganda "Prorops nasuta Waterst.", (Hym. Bethyl.) no Estado de S. Paulo — Brasil. *Arq. Inst. Biol.*, S. Paulo, 13: 233-260.

Vol. 15 — Art. 13 Dezembro de 1944

ESTUDOS DE IMUNIDADE CRUZADA ENTRE O VIRUS BRASILEIRO DA ENCEFALOMIELITE INFECCIOSA DO CAVALO E OS VIRUS AMERICANOS — PELAS PROVAS DE SORO-NEUTRALISAÇÃO

POR

V. Carneiro

Do Instituto Biologico de S. Paulo

SUMÁRIO

1 — OS ANTICORPOS NEUTRALISANTES DO VIRUS NA ENCEFALOMIELITE INFECCIOSA DO CAVALO:

Primeiros estudos: demonstração inicial; critério sorologico na determinação dos tipos. A via cerebral na inoculação das misturas virus-sôro.

A técnica peritoneal e sua superioridade.

Sôros de zonas epizoóticas.

Momento de aparecimento dos anticorpos e persistencia.

Incubação das misturas.

Preparo de sôros neutralisantes: virus ativo e inativado.

Inoculação das misturas em embrião de pinto.

2 — TÉCNICA DE TRABALHO:

Os virus usados. Preparo das misturas. Inoculações peritoneais no camondongo novo. Título dos sôros hiperimunes.

3 — ENSAIOS PRELIMINARES:

Ação patogênica da amostra brasileira por vias periféricas na cobaia e no camondongo.

Estudo comparado dos duas técnicas: a intracerebral e a intraperitoneal. Resultados.

4 — EXPERIÊNCIAS DE SORO-NEUTRALISAÇÃO CRUZADA:

Ensaios com o virus leste. Identidade sorológica. Posição da amostra brasileira no grupo.

Ensaios com o virus oeste e com o venezuelano.

5 — DISCUSSÃO — RESUMO — CONCLUSÕES.

O objetivo dêste trabalho deverá ser estudar o comportamento do virus brasileiro da encefalomielite infecciosa do cavalo, que isolamos em S. Paulo (4-5), em face de amostras de tipos conhecidos, pelas experiências de soroneutralisação cruzada. A série de estudos que vamos agora relatar constitue um complemento às experiências anteriormente publicadas, em 1943, nas quais foi examinada a posição imunológica da amostra brasileira por meio de provas de imunidade ativa cruzada. O virus brasileiro foi aí classificado como uma variante do tipo leste (7).

Como porém o problema dos anticorpos neutralisantes do virus neste grupo de doenças vem adquirindo grande importância, não só do ponto de vista experimental, nos estudos de imunidade, como do ponto de vista aplicado, nos estudos epidemiológicos, e mesmo na rotina de diagnóstico nos animais e no homem, e de determinação de tipo de virus — parece conveniente realizar uma rápida revista dos dados fundamentais que servem hoje de alicerce a uma rotina de trabalho

no assunto. O problema tem sido amplamente investigado e não é nosso objetivo examiná-lo de modo completo, mas apenas condensar o essencial.

E' estranho verificar que, a-pesar-da grande superioridade da técnica de OLITSKY e HARFORD, de reais vantagens sôbre a técnica de inoculação das misturas por via cerebral, que, menos sensível, dá resultados falhos sobretudo com sôros de baixo teor em anticorpos, aquela técnica não se tenha generalizado como era de esperar. Ainda se realisam ensaios, às vêzes sem razão, utilisando a técnica cerebral. Além disso, outros detalhes de rotina, simplificados pelos autores norte-americanos, como o preparo de sôros neutralisantes por exemplo, facilitam os trabalhos seriados dêste gênero.

No nosso caso, tratando-se do estudo comparado da amostra brasileira, de ação patogênica menos acentuada que o virus leste clássico, o bom andamento das experiências cruzadas dependeria de saber, de início, si o virus brasileiro teria a mesma ação patogênica regular e em diluições altas, por via peritoneal, no camondongo novo. As tabelas das nossas experiências mostram que resultados satisfatórios foram obtidos. Além disso, os ensaios dos autores norte-americanos foram realisados com o virus oeste e com o leste e nenhuma experiência havia sido feita com o virus venezuelano por via peritoneal, pois êste terceiro tipo foi identificado mais tarde. Como era de esperar, foi possível estender ao virus venezuelano a mesma rotina de trabalho.

A grande maioria das experiências de soroneutralisação cruzada, que permitiu separar os dois primeiros tipos e depois o terceiro, foi realisada quando ainda não se haviam assinalado essas diferenças de sensibilidade comparada das duas vias de inoculação das misturas e mesmo as séries experimentais mais completas de HOWITT (20) em 1935, realisadas com treze amostras de virus e revendo em conjunto a questão, foram feitas por via cerebral e sempre com sôros hiperimunes.

Nos nossos ensaios de imunidade humoral cruzada, visando estudo de tipos, já foi possível utilisar sempre uma técnica mais sensível e mais precisa e verificar, no caso, a sua grande superioridade. Ela permite assinalar a acentuada especificidade dos tipos de virus e dos sôros correspondentes, mesmo em presença de diluições altas dos primeiros. Não foi possível surpreender, como veremos, neutralisações de grupo.

Os ensaios preliminares, realisados por via cerebral na cobaia, com sôros hiperimunes, depois verificados de alto poder neutralisante,

por via peritoneal são medíocres ou mesmo irregulares. De modo que devíamos esbarrar em sérias dificuldades, ou não teríamos protocolos de tão nítidos resultados, se não dispusessemos da técnica peritoneal. Esta nos forneceu resultados regulares, de alto poder neutralisante, dos sôros obtidos por inoculações de vacinas formoladas de embrião de pinto.

O interêsse experimental e aplicado de uma técnica mais sensível é ainda maior, sobretudo quando já não se trata de sôros hiperimunes, e se considera que a pesquisa de anticorpos neutralisantes do virus na encefalite equina adquire cada vez maior importância em face dos seguintes aspectos de sua aplicação:

1 — Ela poderá, para o futuro, surpreender, no nosso meio, casos humanos de uma doença mais freqüente do que poderia parecer no início dêsses estudos, como já vem acontecendo nos Estados Unidos desde 1938.

2 — Permitirá o diagnóstico da doença no cavalo, quando é em geral difícil o isolamento do virus, principalmente em zonas distantes dos laboratórios, embora, como vamos ver, seja importante que o isolamento e o estudo de novas amostras brasileiras sejam realisados. E ainda poderá surpreender anticorpos nas formas clínicas de evolução menos grave e nas formas frustas.

3 — Finalmente, servirá cada vez mais a estudos epidemiológicos seriados nas diversas espécies animais, que são já realisados principalmente no que se refere às aves, muito responsabilisadas como portadoras de virus.

Pode-se mesmo dizer que esta técnica poderá realisar um trabalho idêntico ao que realisou e ainda continua realisando a rotina de soroproteção na febre amarela. Além disso, em face da pluralidade dos tipos, cabe assinalar que ela é específica para cada tipo. Isso mostra o seu interêsse aplicado na determinação do tipo de virus de cada região, trabalho importante que deve de preferência preceder à vacinação nos fócos e que permite o diagnóstico retrospectivo dêsses fócos.

Primeiros estudos — A primeira demonstração de anticorpos neutralisantes na encefalomielite é fornecida por MEYER, HARING e HOWITT (27) em 1931, quando isolam o primeiro virus americano e clareiam a etiologia do grupo. Encontram êsses autores anticorpos em sôros de cobaia, coelho e macaco; os de cavalo são negativos. Em 1932, HOWITT (18) ocupa-se especialmente do assunto e procura mesmo verificar a existência de tipos sorológicos diversos, tratando cinco amostras do Oeste americano por um sôro preparado

de uma dessas amostras. As cinco amostras são imunològicamente idênticas. No ano seguinte as suspeitas da autora eram demonstradas.

Os sôros de cavalo dão apenas neutralisação parcial e só a hiperimunisação permite revelar, e assim mesmo irregularmente, a presença de anticorpos. As experiências são realisadas inoculando as misturas por via cerebral na cobaia.

Em 1933, TEN BROECK e MERRIL (39) de um lado, GILTNER e SHAHAN (15) de outro, demonstram a existência de diferenças imunológicas entre os virus do Oeste americano e os isolados na costa do Atlântico. Foi o critério sorológico que permitiu estabelecer essas primeiras diferenças entre os dois tipos norte-americanos. Só mais tarde vieram as provas de imunidade tissular cruzada, estudadas em nosso trabalho anterior (7), adotadas depois na determinação dos tipos, de modo a realisar o emprêgo combinado de várias técnicas.

TEN BROECK e MERRIL trabalharam com sôros de coelho e de cavalo hiperimunisados contra os virus do Oeste e contra os do Leste, usando quatro amostras oeste e quatro leste. Resultados uniformes mostram diferenças entre os virus.

Durante as epizootias de Delaware, Maryland e Virgínia, GILTNER e SHAHN notam que as características gerais da doença são comparáveis às do Oeste, se excetuarmos um curso mais agudo, maior mortalidade e alterações histológicas mais intensas. Isolam oito amostras do Leste, trabalham do mesmo modo com sôros de coelho e de cavalo, e os resultados demonstrativos de diferenças são idênticos: os sôros do Oeste não neutralisam o virus leste, nem mesmo com dois ou três volumes. Outras diferenças aparecem, como o período de incubação na cobaia, por via cerebral, de 2 dias para o virus leste e de 3-4 dias para o oeste. Além disso, realisam um ensaio de imunidade ativa e verificam que a proteção contra o oeste não vale contra o leste.

Ambos êsses grupos de pesquisadores inoculavam as misturas virus-sôro por via cerebral na cobaia. Depois dêsses ensaios iniciais de diferenças imunológicas entre os dois tipos, confirmados e completados por outras técnicas e por outros autores, os pesquisadores que se ocuparam do assunto usaram quase sempre sôros hiperimunes e inoculação por via cerebral na cobaia ou no camondongo adulto. Apenas TEN BROECK e MERRIL (39) realisam inoculações igualmente na superfície plantar da cobaia e assinalam melhores resultados com sôros de cavalos convalescentes quando se usam diluições altas do virus. Além disso, TEN BROECK, HURST e TRAUB (38), realisando inquéritos epidemiológicos e examinando sôros de cavalo, assinalam

de passagem, em nota de tabela, que a via peritoneal é mais satisfatória para êste gênero de trabalhos.

A via cerebral e a peritoneal — Os estudos especiais e seriados de COX, OLITSKY, MORGAN e HARFORD, conduzidos durante cêrca de cinco anos, em torno de certos aspectos da imunidade na encefalite equina, são fundamentais, e de seus resultados surgiram os alicerces da rotina de trabalho no assunto.

SHAHAN e GILTNER (37) trazem a contribuição inicial segundo a qual o virus formolado em cérebro de animais confere imunidade. COX e OLITSKY (10), confirmando e completando os dados dêsses autores, determinam a quantidade mínima de virus necessária à proteção contra 1.000-10.000 DLM cerebrais; verificam depois que o virus inativado pelo formol produz uma resistência paralela em todos os sentidos (11-12); e estudam ainda o desenvolvimento dos anticorpos neutralisantes no sôro de cobaias tratadas por quantidades conhecidas de virus ativo e inativado. Um fato surpreendente reclama então novos estudos: cobaias sòlidamente hiperimunisadas contra o virus ativo ou formolado, suportando 1.000-10.000 DLM cerebrais, têm sôros de baixo teor neutralisante, apenas contra 1-10 DLM, ou não neutralisando de todo.

Fatos da mesma ordem eram assinalados anteriormente por HOWITT (18) e por GILTNER e SHAHAN (16): o teor de anticorpos não corresponde à imunidade sólida, assinalando-se mesmo, com freqüência, resultados irregulares. E' claro que com maior freqüência êsses resultados irregulares são obtidos quando já não se usam sôros hiperimunes, mas sôros de infecção natural.

Partindo dêsses dados que a literatura fornecia, de resultados irregulares de inoculação das misturas virus-sôro por via cerebral, OLITSKY e HARFORD (32) levantam a questão de saber se a imunidade humoral devia ser considerada absoluta, ou se, pelo contrário, o baixo teor de anticorpos corria por conta de imperfeições técnicas do método de pesquisa utilisado até 1938 pelos diversos autores. E estudam, com resultados novos, de duplo interêsse, experimental e aplicado, duas ordens de fatos importantes:

Em primeiro lugar, demonstram a existência de diferenças de comportamento das misturas virus-sôro de acôrdo com a via de inoculação utilisada; estendem assim ao virus da encefalomielite dos equídeos o fenômeno de Andrews e Todd, estudado de início na vacina, na peste aviária, depois em outras doenças de virus e, com uma variação especial, na doença de Aujeszky, por SHOPE, por SABIN e por nós (6).

Em segundo lugar, introduzem a técnica de inoculação das misturas virus-sôro no camondongo novo, e por via peritoneal, muito mais sensível, como veremos em ensaios comparados.

Uma grande parte, pelo menos, das diferenças de resultados entre imunidade sólida e baixo teor de anticorpos, é assim explicada e deve correr por conta dós defeitos da técnica cerebral.

A persistência de anticorpos estudada por comparação com a resistência à infecção cerebral é examinada recentemente por CASALS (8).

OLITSKY, COX e SYVERTON (31) já haviam verificado que o camondongo suiço albino, quando adulto, é refractário à inoculação intraabdominal do virus oeste, mas que o novo não o é, dando mesmo incubações mais curtas, de 2 dias, em vez de 3-5. SABIN e OLITSKY (36) verificam que o mesmo camondongo de 15 dias é pràticamente sempre sensível por via peritoneal ou intramuscular; o de um mês resiste em 40-50% dos casos, e o de três meses resiste em 95% das inoculações. MERRIL (26) havia assinalado que o virus leste em cérebro de cobaia, é usualmente fatal para o camondongo de três semanas por via peritoneal. Finalmente, TEN BROECK, HURST e TRAUB (38) haviam assinalado a maior sensibilidade da via peritoneal nas provas de sôro neutralisação.

Os limites da idade do camondongo são de 12-15 e mesmo 16 dias, fixados em vista da ausência de barreiras de proteção natural à invasão do virus, que se desenvolvem com a idade. Maior resistência pela via peritoneal começa surgir aos 21 dias. O pêso médio do camondongo daquela idade é 7-9 grs. (36). Nossos camondongos tinham sempre 12-15-17 dias, sendo do mesmo número de dias cada lote inoculado num ensaio. E' sempre difícil, mesmo nos serviços mais bem equipados, dispôr de grandes lotes do mesmo número de dias. CASALS (8) assinala-o e usa animais até de 17 dias.

Outros estudos especiais sôbre sensibilidade do camondongo e imunidade sob influência da idade, são feitos por MORGAN (28); e KING (24) examina a ação de amostras leste fixadas e recentemente isoladas, mostrando que as primeiras são menos infectantes pelas vias periféricas.

Não é necessário fornecer aqui resultados dos títulos infectantes dos dois tipos de virus usados por OLITSKY e HARFORD nos ensaios por via peritoneal. Nas nossas tabelas, estudadas adiante, aparecem resultados semelhantes, embora os nossos títulos infectantes sejam às vêzes inferiores aos dêsses autores, o que pode ser explicado, em parte,

pelo fato das suas amostras terem sido fixadas por conservação no camondongo, enquanto as nossas o são por passagens na cobaia.

Os resultados comparados, fornecidos pelas duas vias de inoculação, cerebral e peritoneal, usadas simultaneamente nas provas de soroneutralisação, são de fato muito expressivos, com sôros de cobaia, coelho e cavalo, com virus oeste e leste. As misturas são inoculadas no camondongo adulto, de 30 dias, com 0.03 cc. por via cerebral e no camondongo de 12-15 dias, com 0.1 cc. por via peritoneal. Nessas condições um mesmo sôro hiperimune neutralisa de 10 a 1.000 DLM cerebrais e de 10.000 a 1.000.000 de DLM peritoniais (32-33-34).

Em relação aos sôros imunes e aos hiperimunes, Cox e Olitsky haviam já verificado, mesmo por via cerebral, que os últimos contém 10 a 100 vêzes mais anticorpos do que os primeiros.

A diferença significativa de resultados fornecida pelas duas vias, quando comparadas, não corre por conta da diferença de volume inoculado, 0.03 cc. no primeiro caso e 0.1 cc. no segundo, nem pode ser atribuida à diferença de idade dos camondongos usados nas experiências, 30 dias no primeiro caso e 15 no segundo. Os mesmos autores se encarregam de destruir essa interpretação, inoculando misturas idênticas de virus e sôro no cérebro e no peritôneo, na mesma dose de 0.03 cc. e em camondongos da mesma idade, 15 dias. O sôro assim provado neutralisa 10 DLM cerebrais e 100.000 peritoniais. Teremos ocasião de ver, mais adiante, exemplos típicos dessas diferenças.

Sôros de cavalos nas zonas epizoóticas — Nos estudos epidemiológicos, em sôros de cavalos não hiperimunisados, mas que passaram pela infecção natural, uma técnica bem sensível para pesquisa de anticorpos é do maior interêsse, pois o seu teor de anticorpos é sempre 10-100 vêzes mais baixo. Olitsky e Harford verificam, em sôros de cavalos de zonas epizoóticas, que resultados negativos por via cerebral podem transformar-se em positivos por via peritoneal, neutralisando 10 e 100 DLM. Os sôros de cavalos curados, nessas condições, sempre neutralisam o virus, e às vêzes dão mesmo resultados fortemente positivos. Explicam-se assim os resultados negativos obtidos por outros autores com sôros de cavalo. E confirmam-se ainda os ensaios de Ten Broeck, Hurst e Traub, de Giltner e Shahan, que mostram que sôros de cavalos sem doença aparente podem revelar anticorpos.

Momento de aparecimento dos anticorpos — Outra questão a registrar aqui diz respeito ao rápido aparecimento dos anticorpos e sua persistência. Howitt (18) verifica anticorpos desde o quinto dia, com resultados mais nítidos do sétimo ao nono.

HURST (23), em sôros de macaco, encontra resultados quatro dias depois da inoculação periférica de virus. O aparecimento dos anticorpos é pois muito rápido. CASALS (8) verifica o aparecimento, no camondongo, excepcionalmente, no terceiro dia e, regularmente, no nono, persistindo até quatro meses pelo menos. MORGAN e OLITSKY estudam as oscilações do teor de anticorpos no sôro por um período de duas semanas a seis meses e meio. WRIGHT (40), trabalhando com o virus leste, assinala o seu aparecimento 6, e mesmo 2 dias depois do início dos sintomas, e sua presença até 8 meses depois. FOTHERGILL, citado por WRIGHT, chega a resultados idênticos.

Sôros de cavalos de áreas epizoóticas de Virgínia colhidos de 6 meses e quatro anos depois do restabelecimento ou de permanência na região, são examinados por OLITSKY e HARFORD. Entre outros exemplos, vê-se aí um sôro de cavalo curado, que examinado quatro anos depois, neutralisa 100.000 DLM peritoniais. E' desnecessário ressaltar o interêsse dessas verificações nos estudos epidemiológicos e no diagnóstico retrospectivo dos fócos. Em todo caso, não se pode excluir dêste último achado a possibilidade de reinfecções posteriores, produzidas por novas picadas de mosquitos em áreas enzoóticas, em animais imunes em conseqüência de infecção anterior, sem provocar novas manifestações clínicas mas reativando o título do sôro, isto é, reproduzindo na natureza condições que se podem realisar no laboratório.

Incubação das misturas — Já em 1932, HOWITT havia verificado que a incubação das misturas, no caso da encefalite equina, é desnecessária. OLITSKY e HARFORD confirmam-no. O poder neutralisante dos sôros não é aumentado quando se conservam as misturas a 37° durante 2 horas e meia. Nossos ensaios foram feitos, em geral, na base dêsses resultados. Novas confirmações, depois de concluidos nossos ensaios, aparecem recentemente (14).

Os sôros neutralisantes — Resta ainda examinar a preparação de sôros neutralisantes. Como vimos anteriormente, a vacina formolada reproduz, em todos os aspectos, a antigenicidade do virus (11-29-35); isto é, no que se refere ao poder protetor contra doses consideráveis do virus inoculado por via cerebral, como no que diz respeito ao teor em anticorpos no sôro e ainda no que se refere à duração da imunidade, há paralelismo nos resultados experimentais nos ensaios comparados realisados com o virus ativo e com o virus inativado pelo formol; e quando diferenças possam surgir, elas parecem apenas quantitativas. Êsses estudos têm importância no preparo de sôros neutralisantes em condições experimentais, aqui no caso

como nas experiências de imunidade ativa cruzada, estudadas em nosso trabalho anterior (7). Até há alguns anos, o preparo de sôros neutralisantes nas diversas espécies era realisado pela inoculação de virus ativo, que pode ocasionar grande mortalidade nos animais de laboratório (20); a êste inconveniente se pode adicionar o que resulta do trabalho com material virulento em altas doses, com riscos de infecção de laboratório e manutenção de portadores.

Nossas experiências foram realisadas, sistemàticamente, com sôros de coelho hiperimunisados, que haviam recebido várias doses de vacina formolada de embrião de pinto, de título infectante prèviamente conhecido e de poder protetor, em geral, contra 100-1.000-10.000 DLM cerebrais. Obtivemos igualmente um sôro de cavalo hiperimunisado com vacina, e outra vez utilisamos um sôro de cobaias que receberam vacina e virus. Mas êstes dois últimos sôros não serviram às provas cruzadas.

Na cobaia, duas ou três séries de vacinas formoladas produzem títulos neutralisantes do sôro melhores do que uma única série. Mas no coelho ensaios de OLITSKY e MORGAN mostram que os sôros são produzidos por meio de uma única série de três inoculações subcutâneas de 5 cc. de vacinas formoladas com sete dias de intervalo. Nos testes peritoneais no camondongo êstes sôros de coelho neutralisam até 100.000-1.000.000 e 10.000.000 de DLM. Uma segunda série de vacinas produz um sôro do mesmo valor neutralisante (35).

Inoculação das misturas virus-sôro em embrião de pinto — Na encefalomielite equina a pesquisa de anticorpos neutralisantes pode ainda ser realisada por inoculação das misturas em embrião de pinto. Além disso, tem sido estudada igualmente a inoculação em culturas de tecido. HUANG (22) conclue que a técnica de inoculação em cultura de tecido é 100-1.000 vêzes mais sensível do que a técnica intracerebral no camondongo, sendo comparável, nos seus resultados, à técnica peritoneal.

HIGBIE e HOWITT (17), quando demonstram a possibilidade de cultura do virus em embrião de pinto, estudam igualmente sua aplicação ao estudo dos anticorpos, conforme verificações de BURNET e GALLOWAY (3) em trabalhos realisados com o virus da estomatite vesiculosa do cavalo. Esta técnica tem sido utilisada por BEAUDETTE (1-2) em sôros de aves. Fizemos um ensaio dêste gênero, utilisando um sôro hiperimune de coelho prèviamente dosado no camondongo por via peritoneal. Mas apesar de sua real utilidade, não nos parece que seja mais sensivel que a técnica peritoneal para revelar altos titulos neutralisantes dos sôros. E' interessante esclarecer êste ponto por meio de

experiências comparadas e reclama novos estudos. O sôro oeste usado neutralisava 1.000-10.000 DLM peritoneais no camondongo e apenas 10 DLM por inoculação em embrião de pinto de 14 dias.

Resta ainda referir que os anticorpos neutralisantes podem ser revelados no líquido céfalo-raquidiano, no homem, no macaco, no coelho, assim como no cérebro de animais vacinados (21-30).

TÉCNICA DE TRABALHO

Em linhas gerais, seguimos a técnica de OLITSKY e HARFORD nos estudos realisados pela via peritoneal.

1 — Os virus usados — São os mesmos que serviram nos nossos ensaios anteriores, de imunidade ativa cruzada. Serviram não só nos ensaios de soroneutralisação cruzada, còmo no preparo de vacinas formoladas de embrião de pinto, que foram utilisadas para hiperimunisação dos coelhos fornecedores de sôros neutralisantes. São eles: a amostra brasileira, que isolamos em 1937 de um foco diagnósticado aqui em S. Paulo; uma amostra oeste, uma leste e uma venezuelana. Todas essas amostras vêm sendo mantidas no laboratório por passagens cerebrais pela cobaia, sendo os animais sacrificados quando sintomas típicos se instalaram e estão caídos em paralisia mais ou menos generalisada. No momento de se realisarem as experiências de soroneutralisação, as amostras em estudo sofriam três passagens pelo camondongo adulto de 30-40 dias, inoculado com 0.03 por via cerebral, em seguida à anestesia pelo eter. Os camondongos, quando caídos, eram sacrificados pelo cloroformio. Os cérebros removidos eram mantidos a + 4° C. durante alguns dias, em glicerina fosfatada de pH7.2, ou usados no dia seguinte à necropsia.

2 — Preparo das misturas virus-sôro — Era realisado de acôrdo com a técnica habitualmente usada neste gênero de ensaios Uma emulsão inicial de cérebros de camondongos, triturados finamente no gral, é preparada a 20% em água fisiológica e centrifugada ràpidamente, cerca de 10 m. a 2.000 r. m. O sobrenadante é removido e diluições sucessivas são obtidas com 0.5 c. c. + 4.5 c. c. de água fisiológica, variando em geral, de 2×10^{-2} a 2×10^{-8}, conforme o ensaio a realisar e o título infectante do virus. Em pequenos tubos, a cada 0.25 c. c. de virus se adiciona igual volume de sôro, de modo a se obterem em geral, misturas virus-sôro de 10^{-1} a 10^{-4} para os sôros neutralisantes e de 10^{-3} a 10^{-7} para os contrôles.

As tabelas mostram em detalhe as diluições usadas para cada sôro e para cada virus. As misturas eram mantidas cerca de 10 m. à temperatura ambiente e agitadas antes de serem inoculadas.

A cada série, onde um sôro leste, por exemplo, é tratado pelo virus brasileiro, uma segunda série feita de sôro leste e virus leste é adicionada, isto é, feita do sôro neutralisante em presença do virus correspondente. Além disso, o virus era tratado, em uma terceira série pelo sôro normal. Eram realisados, assim, contrôles do sôro e contrôles do virus.

3 — Inoculações — Eram realisadas no camondongo suiço albino, de 15-16-17 dias, por via peritoneal, com 0.1 c.c. Em cada experiência, o lote inteiro era do mesmo número de dias; de modo que usamos um lote de 15, outro de 15, outro de 16, outro de 17 dias e mesmo um lote de 12 dias. Neste detalhe

reside a dificuldade prática da técnica, pois nem sempre é facil dispôr de grandes lotes de camondongos nascidos no mesmo dia, para experiências em série. E em alguns ensaios era necessário aguardar a possibilidade de obter lotes maiores.

Trabalhando com o virus oeste, mesmo depois de várias passagens cerebrais pelo camondongo adulto, em seguida a um primeiro ensaio satisfatório, encontramos certa dificuldade em obter títulos infectantes altos por via peritoneal, no camondongo novo. O fato parece ligado à menor patogenicidade da amostra com que trabalhamos, pois os autores norte-americanos obtiveram resultados satisfatórios. Uma tentativa em camondongos mais novos, de 12 dias, ainda não desmamados, e conservados nas gaiolas com as mães, não fornece resultados muito melhores.

Ainda de acôrdo com a técnica de OLITSKY e HARFORD, cada diluição usada era inoculada em 3 camondongos. Os animais inoculados eram diàriamente examinados várias vezes, para surpreender sintomas iniciais e verificar o conjunto de sintomas típicos e a evolução dentro dos prasos habituais. A observação era prolongada por um período mínimo de 10 dias. A DLM peritoneal era dada pela diluição final de virus-sôro normal matando pelo menos, 2 de 3 inoculados. Tem sido utilisado, neste caso, a avaliação dos resultados pelo método de Reed e Muench, que fornece índices mais precisos.

Fizemos, de início, na cobaia, por via cerebral, alguns ensaios, que serão examinados comparativamente com os da via peritoneal no camondongo, mostrando a superioridade significativa desta última técnica. Tentamos ainda utilisar cobaias novas, de 30 dias e 220 grs. ou de 15 dias e 190 grs. Os resultados iniciais da ação patogênica da amostra brasileira, embora positivos, parecem irregulares, pelo que renunciamos à tentativa de organisar uma rotina na cobaia.

Sôros neutralisantes — Os trabalhos de COX e OLITSKY demonstraram, como vimos, que o virus formolado de cérebro de camondongo reproduz a antigenicidade do virus ativo. OLITSKY e MORGAN, como consequência, demonstraram que as vacinas formoladas inoculadas no coelho fornecem sôros de poder neutralisante paralelo ao que é dado pelo virus. Com maiores razões êsses dados deviam ser verificados em ensaios realisados não mais com vacinas de cérebro, mas com vacinas de embrião de pinto, de título infectante do virus prèviamente dosado na cobaia por via cerebral, 0.1 c. c. $\times$ 10^{-7} ou 10^{-8} e de poder protetor sólido contra 100-1.000-10.000 DLM cerebrais.

O preparo dos nossos sôros, baseado nessas aquisições prévias, foi realisado com três ou quatro inoculações subcutâneas de doses crescentes de vacina formolada de embrião de pinto, realisadas no coelho. Algumas dessas vacinas eram de preparação recente, mas outras tinham uma longa conservação na geladeira. Assim a vacina oeste tinha 16 meses de conservação e forneceu um sôro neutralisante de resultados satisfatórios, comparavel aos sôros de outras vacinas preparadas recentemente. Essas indicações estão de acôrdo com ensaios relatados em nosso trabalho anterior, onde vacinas conservadas 10, e mesmo 22 mêses na geladeira, não sofreram diferença apreciavel no seu poder antigenico (7).

As doses de vacina usadas na hiperimunisação dos coelhos eram 2 c. c., 4 c. c., 8 c. c. e em alguns casos, uma quarta dose de 8 c. c. As sangrias eram realisadas cerca de 16-20 dias depois da terceira dose de vacina e os sôros assim obtidos protegiam o camondongo novo contra 10.000-100.000 e mesmo 1.000.000 de DLM peritoneais do mesmo virus. O título neutralisante do sôro variava de acôrdo com a DLM do virus por via peritoneal.

ENSAIOS PRELIMINARES

1 — Ação patogênica da amostra brasileira por vias periféricas — Em nossos trabalhos anteriores estão referidos os dados relativos à amostra brasileira por via cerebral, para a cobaia, o camondongo, o pombo e o coelho; índices da DLM para a cobaia e para o camondongo foram indicados, em material de cérebro de cobaia e de culturas do virus em embrião de pinto. No pombo, por via cerebral, resultados positivos foram obtidos, com sintomatologia característica e passagens de contrôle positivas. Nossos resultados no pombo são mesmo dos primeiros que a literatura registra, em seguida às experiências de REMLINGER e BAILLY, realisadas com o virus argentino, e de GILTNER e SHAHAN com o leste. E os estudos de ação dêsses virus nas aves vêm adquirindo grande interêsse, depois que são responsabilisadas, com insistência, como portadoras.

Restava examinar a ação da amostra brasileira pelas outras vias de inoculação. Fizemos ensaios na cobaia e no camondongo, usando a via peritoneal, a muscular e a subcutânea. Os resultados foram os seguintes:

A — Material de cérebro de cobaia — Inoculado na cobaia de 300 grs., por via subcutânea, muscular e peritoneal, com 0.5 c.c. de emulsão e 1 p. 20, fornece resultados negativos.

Inoculado no camondongo de 40 dias, por via peritoneal e subcutânea, com 0.2 c.c. de virus a 1 p. 10, fornece resultados negativos, quando o mesmo material com 0.03 por via cerebral é positivo com incubação de 2½-3 dias.

B — Material de cérebro de camondongo — O virus conservado sempre por passagens pela cobaia, sofre primeiramente três passagens em série pelo cérebro de camondongo adulto, de 30-40 dias e é de novo experimentado.

Na cobaia adulta, de 340 grs. com 1 c. c. de virus e 1 p. 10 por via peritoneal mata as duas inoculadas, com incubação de 5 dias; por via muscular e subcutânea mata uma cobaia de cada duas inoculadas. Na cobaia nova, de 15 dias, 180-200 grs. de peso, os resultados são mais satisfatórios. Assim:

Via peritoneal com 0.5 c. c. de virus a 1 p. 20, resultados positivos em 2½ dias.

Via muscular com 0.5 c. c. de virus a 1 p. 20, resultados positivos em 5 dias.

Via subcutânea com 0.5 c. c. de virus a 1 p. 20, resultados positivos em 5 dias.

Via cerebral com 0.1 c. c. de virus a 1 p. 20 , resultados positivos em 2 dias.

Como se vê, na cobaia nova o virus parece regularmente infectante, mas repetindo esses ensaios, os resultados já não foram tão regulares.

No camondongo novo, de 17 dias e 8 grs. de peso, o material de cérebro de camondongos, com três passagens, fornece resultados satisfatórios pelas diversas vias, subcutanea, muscular, peritoneal. A DLM peritoneal alcança mesmo diluições altas, 10^{-5}, 10^{-6}. As inoculações periféricas, subcutânea, muscular e peritoneal foram feitas com 0.1 c.c. e por via cerebral, em seguida à anestesia pelo eter, com 0,03 cc.. O período de incubação é, em geral, mais curto do que o que se verifica nos adultos, sendo de cerca de 48 horas.

2 — Estudo comparado das duas técnicas. Fizemos ainda um estudo preliminar no sentido de verificar como se comportariam os nossos sôros neutralisantes, obtidos do virus brasileiro, por inoculação das misturas por via cerebral. Essas inoculações foram realidadas na cobaia, com sôro de cavalo, de cobaia e de coelho. Os mesmos sôros foram depois ensaiados por via peritoneal no camondongo novo, de modo a fornecerem um resultado comparado das duas técnicas, isto é, repetindo, embora em espécies diversas, os ensaios de OLITSKY e HARFORD. Os resultados são de fato muito expressivos, como mostram as tabelas 1 e 2, confirmando as conclusões desses autores. Assim,

por via cerebral —	sôro de cobaia neutralisa	100 DLM
	" " coelho "	10 DLM
	" " cavalo "	1 DLM
por via peritoneal —	sôro de cobaia neutralisa	100.000 DLM
	" " coelho "	1.000 e 1.000.000 DLM
	" " cavalo "	100 DLM

isto é, a via peritoneal do camondongo novo neutralisa 1.000 DLM mais que a cerebral na cobaia. No caso do sôro do coelho, que em ensaio posterior neutralisa 1.000.000 de DLM do virus, a diferença de sensibilidade das duas técnicas é ainda mais acentuada, neutralizando a via peritoneal 100.000 DLM mais que a cerebral.

Como se vê e como mostram as tabelas 1 e 2 que resumem esses resultados das duas técnicas, utilisadas com os mesmos sôros, há uma diferença constante e significativa de resultados. Seria pois bem mais dificil, no nosso caso, organisar uma rotina utilisando a via cerebral; e os resultados nunca seriam tão seguros quanto os que revela a via

TABELA 1

ENSAIOS PRELIMINARES DE DOSAGEM DO PODER NEUTRALISANTE DE SOROS DE ANIMAIS HIPERIMUNISADOS POR INOCULAÇÃO DAS MISTURAS POR VIA CEREBRAL NA COBAIA.

1– SÔRO DE COBAIAS–RECEBERAM DUAS DOSES DE 0,5 c c DE VACINA DE EMBRIÃO DE PINTO FORMOLADA POR VIA SUBCUTÂNEA E CERCA DE 15 DIAS DEPOIS, VIRUS BRASILEIRO A 1 p.10 POR VIA CEREBRAL. SANGRIA: 20 DIAS DEPOIS.

2– SÔRO DE COELHO 137– RECEBEU 2–4–8 c c DE VACINA BRASILEIRA POR VIA SUBCUTÂNEA. SANGRIA: 15 DIAS DEPOIS DA TERCEIRA DOSE VACINANTE.

3– SÔRO DE CAVALO R.C.– RECEBEU 10–10–20–40–80 c c DE VACINA BRASILEIRA POR VIA SUBCUTÂNEA EM DOSES SEPARADAS POR INTERVALOS DE CERCA DE 10 DIAS. SANGRIA: 14 DIAS DEPOIS DA ÚLTIMA DOSE.

SOROS	DILUIÇÕES DO VÍRUS BRASILEIRO						DLM
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	NEUTRALISADAS
1– SÔRO DE COBAIAS	□ ■	■ ■	□ □	□ □			100
CONTROLE SÔRO COBAIA NORMAL	■ ■	■ ■	■ ■	■ ■	■ □		
2– SÔRO COELHO 137	■ ■	■ ■	■ ■	□ □			1
CONTROLE SÔRO COELHO NORMAL		■ ■	■ ■	■ ■	□ □	□ □	
3– SÔRO CAVALO R. C.	■ ■	■ ■	■ ■				?
CONTROLE SÔRO CAVALO NORMAL		■ ■	■ ■	■ ■	□ □	□ □	

DUAS COBAIAS INOCULADAS PARA CADA DILUIÇÃO 0,1 c c VIA CEREBRAL

■ – COBAIA MORRE E O SÔRO NÃO NEUTRALISA.

□ – COBAIA SOBREVIVE E O SÔRO NEUTRALISA.

peritoneal. Além disso, nesta última técnica, a possibilidade de tratar um sôro por várias diluições diversas do virus, de 10^{-1} a 10^{-4} ou 10^{-5}, permite surpreender a especificidade absoluta dos tipos em face das provas de sôro-neutralisação cruzada. Um sôro leste não neutralisa um virus oeste ou venezuelano nem mesmo quando diluições altas dêsses virus são usadas e não há pois, qualquer indício de neutralisação de grupo.

TABELA 2

DOSAGEM DO PODER NEUTRALISANTE DE SOROS HIPERIMUNES POR INOCULAÇÃO DAS MISTURAS POR VIA PERITONEAL NO CAMONDONGO NOVO.
1–SÔRO DE COBAIA
2–SÔRO DE COELHO 137
3–SÔRO DE CAVALO R.C.
OS MESMOS SOROS TABELA 1.

SOROS	DILUIÇÕES DO VIRUS BRASILEIRO							DLM NEUTRALISADAS
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	
1–SOROS DE COBAIAS	□□□	□□□	□□□	□□□	□□□			100.000
CONTROLE COBAIA NORMAL		■■■	■■■	■■■	■■■	■■■	■□□	
2–COELHO 137 (1)	■□□	□□□	□□□	□□□				10.000
CONTROLE SÔRO NORMAL			■■■	■■■	■■■	□□□	□□□	
3–CAVALO R.C. (2)	■■■	■■□	□□□	□□□				100
CONTROLE SÔRO NORMAL			■■■	■■■	■■■	□□□		

(1)–ÊSTE MESMO SÔRO EM OUTRO ENSAIO NEUTRALISA 100.000 DLM PERITONEAIS.
(2)–O TÍTULO BAIXO DO SÔRO DO CAVALO R.C. PARECE EXPLICAVEL POR SE TRATAR DE UM CAVALO VELHO, DE 17 ANOS EMBORA EM BOM ESTADO GERAL. ELE RECEBEU CINCO DOSES DE VACINA FORMOLADA SOMANDO 160c.c
TRES CAMONDONGOS INOCULADOS PARA CADA DILUIÇÃO – 0,1cc PERITONEAL
□ NEUTRALIZAÇÃO POSITIVA – OS CAMONDONGOS SOBREVIVEM.
■ NEUTRALIZACAO NEGATIVA – OS CAMONDONGOS MORREM.

Dispondo dêste conjunto de dados preliminares, foi possivel, em seguida, realisar as experiências cruzadas no camondongo novo e por via peritoneal, depois de realisadas algumas provas prévias de poder neutralisante de sôros hiperimunes de coelho em relação aos virus correspondentes.

EXPERIÊNCIAS DE SORO-NEUTRALISAÇÃO CRUZADA

Foi necessário, nestas séries de experiências, seguir uma seqüência mais ou menos arbitrária, de modo a aproveitar, em cada ensaio, o lote de camondongos novos, disponivel no dia respectivo.

Essas experiências deviam consistir em tratar a amostra de virus brasileiro em estudo por sôros hiperimunes obtidos da mesma amostra e depois por um sôro leste, um oeste e um venezuelano. E do mesmo modo, em tratar as amostras típicas, leste, oeste e venezuelana, por sôros obtidos da amostra brasileira e por sôros leste, oeste e venezuelano. Além dos contrôles do valor neutralisante dos sôros para as amostras respectivas, realisados prèviamente ou no momento da prova cruzada, ou depois desta, contrôles do virus em presença de sôros normais eram sempre incluidos em cada experiência, para cada virus e para cada lote inoculado.

Experiência n.º 1 — Depois de verificado o valor neutralisante de vários sôros, em presença dos virus correspondentes, demonstrando sempre que uma série de 3-4 doses vacinantes no coelho fornece um sôro sempre satisfatório, o primeiro ensaio realisado consistiu em tratar o virus leste por um sôro leste e por um sôro brasileiro, como se vê na tabela 3. Êste ensaio foi realisado inoculando misturas virus-sôro de diluições 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} do virus leste em presença dos dois sôros, em condições idênticas. Ao mesmo tempo, o virus leste colocado em presença de sôro normal de coelho, é inoculado em diluições de 10^{-3} a 10^{-8}, como contrôle de virus. As misturas são agitadas e cerca de 10 m. depois, inoculadas em camondongos de 17 dias, com 0.1 c.c. por via peritoneal.

Na tabela se vê claramente que o virus leste em presença do sôro normal é infectante até a diluição 10-7, quando mata dois camondongos, de três inoculados. Ainda se vê que o sôro leste e o sôro brasileiro neutralisam regularmente 100 - 1.000 - 10.000 - 100.000 - 1.000.000 de DLM peritoneais.

Êste resultado é, pois, demonstrativo de uma identidade sorológica completa, dentro dêste tipo de ensaio, e nenhuma diferença parece existir entre os dois virus.

As diferenças de poder protetor, de vacinas da amostra brasileira em face do virus leste, assinaladas em nossos trabalho anterior, em provas de imunidade tissular, aqui não se verificam e um sôro brasileiro neutralisa o virus leste do mesmo modo que o faz um sôro leste típico.

Experiência n.º 2 — Em conseqüência dos resultados do ensaio anterior, restava completar a prova cruzada, isto é, tratar o virus brasileiro pelo mesmo sôro e pelo sôro leste. A tabela 4 fornece os resultados deste segundo ensaio. Como se devia prever diante do ensaio anterior, esta prova mostra, do mesmo modo, que o virus bra-

TABELA 3

1– SÔRO BRASILEIRO — VIRUS LESTE
2– SÔRO LESTE — " "
3– SÔRO NORMAL — " "

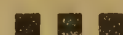
SOROS	VIRUS	DILUIÇÕES	RESULTADOS CAMONDONGOS 0,1 PERITONEAL	
1– SÔRO BRASILEIRO DE COELHO HIPERIMUNISADO COM VACINA FORMOLADA	VIRUS LESTE	10^{-1}	□ □ □	1.000.000 DLM PERITONEAIS NEUTRALISADAS
	" "	10^{-2}	□ □ □	
	" "	10^{-3}	□ □ □	
	" "	10^{-4}	□ □ □	
	" "	10^{-5}	□ □ □	
2– SÔRO LESTE	VIRUS LESTE	10^{-1}	□ □ □	1.000.000 DLM
	" "	10^{-2}	□ □ □	
	" "	10^{-3}	□ □ □	
	" "	10^{-4}	□ □ □	
	" "	10^{-5}	□ □ □	
3– SÔRO NORMAL DE COELHO CONTROLE	VIRUS LESTE	10^{-3}	■ ■ ■	
	" "	10^{-4}	■ ■ ■	
	" "	10^{-5}	■ ■ ■	
	" "	10^{-6}	■ ■ ■	
	" "	10^{-7}	■ ■ □	
	" "	10^{-8}	□ □ □	

sileiro é neutralisado em condições idênticas, por um sôro leste, que aí neutralisa até 100.000 DLM do virus brasileiro.

Dêstes dois ensaios iniciais resulta uma identidade sorológica completa entre o virus brasileiro e o virus leste típico, nessas provas de neutralisação cruzada. Dentro dêste gênero da experiência não é possível pois surpreender diferenças entre os dois virus. Assim parecem explicadas as razões por que por meio do mesmo gênero de ensaios, como veremos mais longe, em outras regiões do Brasil, foram reve-

TABELA 4

1– SÔRO LESTE — VIRUS BRASILEIRO
2– SÔRO OESTE — " "
3– SÔRO VENEZUELANO — " "
4– SÔRO NORMAL — " "

SOROS	VIRUS	DILUIÇÕES	RESULTADOS CAMONDONGOS DE 18 DIAS
1–SÔRO LESTE	VIRUS BRASILEIRO	10^{-1}	
		10^{-2}	
		10^{-3}	
		10^{-4}	
2–SÔRO OESTE	VIRUS BRASILEIRO	10^{-1}	
		10^{-2}	
		10^{-3}	
		10^{-4}	
3– SÔRO VENEZUELANO	VIRUS BRASILEIRO	10^{-1}	
		10^{-2}	
		10^{-3}	
		10^{-4}	
4–SÔRO COELHO NORMAL CONTROLE	VIRUS BRASILEIRO	10^{-3}	
		10^{-4}	
		10^{-5}	
		10^{-6}	
		10^{-7}	
		10^{-8}	

lados anticorpos neutralisantes do virus leste. As diferenças entre os dois virus, assinaladas em nosso trabalho anterior, quando existem, só aparecem nas provas de imunidade tissular.

Experiência n.º 3 — A mesma tabela n.º 4 mostra o resultado das experiências que consistiram em tratar o virus brasi-

TABELA 5

1–SÔRO VENEZUELANO — VIRUS VENEZUELANO
2–SÔRO BRASILEIRO — " "
3–SÔRO NORMAL — " "

SOROS	VIRUS	DILUIÇÕES	RESULTADOS
1– SÔRO VENEZUELANO	VIRUS VENEZUELANO	10^{-1}	□ □ □
	" "	10^{-2}	□ □ □
	" "	10^{-3}	□ □ □
	" "	10^{-4}	□ □ □
2– SÔRO BRASILEIRO	VIRUS VENEZUELANO	10^{-1}	■ ■ ■
	" "	10^{-2}	■ ■ ■
	" "	10^{-3}	■ ■ ■
	" "	10^{-4}	■ ■ ■
3–SÔRO COELHO NORMAL CONTROLE	VIRUS VENEZUELANO	10^{-4}	■ ■ ■
	" "	10^{-5}	■ ■ ■
	" "	10^{-6}	□ □ □
	" "	10^{-7}	□ □ □
	" "	10^{-8}	□ □ □

leiro por um sôro oeste e por um sôro venezuelano, nas mesmas condições usadas para o sôro leste. Aí se vê que enquanto o sôro leste neutralisa o virus brasileiro em tôdas as diluições usadas, os sôros oeste e venezuelano não o fazem mesmo quando em presença de diluições altas e número reduzido de DLM peritoneais. Um sôro oeste e um venezuelano não neutralisam nem mesmo 10 DLM peritoneais da amostra brasileira.

As provas de sôro-neutralisação cruzada realisadas com esta técnica, mostram pois desde já, duas conclusões essenciais: em primeiro lugar, ausência de qualquer relação imunológica do nosso virus com o oeste, ou com o venezuelano, o que não é senão uma confirmação das experiências de imunidade tissular, descritas no trabalho anterior; em segundo lugar, como êste gênero de ensaio, no caso da encefalomielite

TABELA 6

CONTROLE DO VALOR NEUTRALISANTE DO SÔRO OESTE.

SOROS	VIRUS	DILUIÇÕES	RESULTADOS CAMONDONGOS DE 16 DIAS
SÔRO OESTE	VIRUS OESTE	10^{-1}	□ □ □
	" "	10^{-2}	□ □ □
	" "	10^{-3}	□ □ □
	" "	10^{-4}	□ □ □
SÔRO NORMAL DE COELHO	VIRUS OESTE	10^{-4}	■ ■ ■
	" "	10^{-5}	■ ■ □
	" "	10^{-6}	□ □ □
	" "	10^{-7}	□ □ □

TABELA 7

INOCULAÇÕES DAS MISTURAS VIRUS — SÔRO EM EMBRIÃO DE PINTO

1–SÔRO BRASILEIRO — VIRUS OESTE
2–SÔRO OESTE — " "
3–SÔRO NORMAL — " "

1– SÔRO BRASILEIRO	VIRUS OESTE	10^{-1}	■ ■ ■
	" "	10^{-2}	■ ■ ■
	" "	10^{-3}	■ ■ ■
2–SÔRO OESTE	VIRUS OESTE	10^{-1}	■ ■ ■
	" "	10^{-2}	■ ■ □
	" "	10^{-3}	□ □ □
3–SÔRO NORMAL DE COELHO CONTROLE	VIRUS OESTE	10^{-2}	■ ■
	" "	10^{-3}	■ ■
	" "	10^{-4}	■ ■
	" "	10^{-5}	□ □
	" "	10^{-6}	□ □

equina, é rigorosamente específico, pois não se pode, mesmo com sôros de grande poder neutralisante, em face de limites quase de doses infectantes, surpreender qualquer indício de neutralisação de grupo.

Contrôles do poder neutralisante dos sôros oeste e venezuelano usados neste ensaio, aparecem em outras tabelas com resultados sempre satisfatórios.

Experiência n.º 4 — Neste ensaio, como mostra a tabela n.º 5, um sôro brasileiro é colocado em presença de várias diluições do virus venezuelano; contrôles do sôro venezuelano aparecem nesta série, além dos contrôles do virus venezuelano em presença do sôro normal. Esta experiência completa o ensaio anterior no que se refere ao virus venezuelano e o brasileiro.

Como conclusão dessas duas experiências, tabelas 4 e 5, verifica-se, em resumo, que nem o sôro venezuelano neutralisa o virus brasileiro, nem o sôro brasileiro neutralisa o virus venezuelano.

TABELA 8

1- SÔRO BRASILEIRO — VIRUS OESTE
2- SÔRO OESTE — " "
3- SÔRO NORMAL — " "
INOCULAÇÕES EM CAMONDONGOS DE 12 DIAS

1- SÔRO OESTE	VIRUS OESTE	10^{-1}	□ □ □
	" "	10^{-2}	□ □ □
	" "	10^{-3}	□ □ □
2- SÔRO BRASILEIRO	VIRUS OESTE	10^{-1}	■ ■ ■
	" "	10^{-2}	■ ■ ■
	" "	10^{-3}	■ ■ ■
3- SÔRO NORMAL COELHO CONTROLE	VIRUS OESTE	10^{-3}	■ ■ ■
	" "	10^{-4}	□ □ □
	" "	10^{-5}	□ □ □

Experiência n.º 5 — Restava, para terminar, completar os ensaios cruzados com o virus oeste, isto é, tratar o virus oeste pelo sôro brasileiro. Um ensaio preliminar de contrôle do sôro oeste se pode ver na tabela 6, onde êle neutralisa 1.000-10.000 DLM peritoneais.

Neste ensaio aparecem dificuldades que resultam do poder infectante mais irregular do virus oeste por via peritoneal, o que parece ligado à amostra com que trabalhamos. As várias repetições do mesmo ensaio não permitem resultados melhores; mas, de qualquer modo, foi possível completar o ensaio cruzado.

Fizemos um ensaio por inoculação das misturas na membrana corioalantoide de embrião de pinto, tabela 7. Os resultados são demonstrativos, mas não tão nítidos quanto os que até agora relatamos. O sôro oeste aí usado neutralisa o virus oeste apenas a 1 p. 1.000 e o sôro brasileiro, nas mesmas condições, não neutralisa. Êste ensaio parece indicar que esta técnica não é mais sensível que a peritoneal, pois êste mesmo sôro oeste neutralisa 1.000 ou 10.000 DLM peritoneais do virus oeste no camondongo novo, em um ensaio preliminar, tabela 6.

Experiência n.º 6 — O ensaio do virus oeste pelo sôro brasileiro foi tentado ainda em camondongos mais novos, de 12 dias, na suposição de que nessas condições o virus pudesse ter poder infectante mais regular em diluições altas. Mas ainda aí o virus oeste só é infectante até 10^{-3}. A tabela n.º 8 mostra que enquanto o sôro oeste neutralisa 100 DLM do virus oeste, o sôro brasileiro não o faz, nem mesmo em presença de número dez ou cem vêzes menor de DLM peritoneais.

DISCUSSÃO

O conjunto dêstes ensaios de sôro-neutralisação cruzada, em confronto com as experiências relatadas em nosso trabalho anterior, de imunidade tissular, conduz a uma análise rápida do valor comparativo das duas técnicas e dos resultados que no nosso caso elas fornecem.

Do ponto de vista das provas de sôro-neutralisação cruzada, a amostra brasileira de São Paulo, que isolamos em 1937, se comporta pois como uma amostra leste típica, sem que qualquer diferença de comportamento tenha sido verificada em provas cruzadas.

Dentro dêstes ensaios, um sôro leste neutralisa o virus brasileiro regularmente nas diversas diluições ensaiadas, mesmo nas mais baixas, do mesmo modo que neutralisa o virus leste correspondente, usado no preparo do sôro. Êste resultado nada tem de surpreendente e devia mesmo prever-se em face dos resultados das provas realisadas de imunidade ativa cruzada, nas quais a vacina leste protege contra o virus brasileiro.

Mas, além disso, um sôro brasileiro neutralisa do mesmo modo o virus leste, exatamente como o faz o sôro leste correspondente. Êste

resultado já não se podia prever que surgisse tão uniformemente, ainda em face das experiências de imunidade ativa, nas quais dificilmente a vacina brasileira protege contra o virus leste.

As experiências complementares, de sôro brasileiro em presença de virus oeste e venezuelano, e de sôro venezuelano e oeste, em presença de virus brasileiro, forneceram resultados que se deviam esperar: o sôro brasileiro não neutralisa o virus oeste nem o venezuelano. E do mesmo modo, os sôros oeste e venezuelano não neutralisam o virus brasileiro. Há aí a assinalar a especificidade absoluta dos tipos e a ausência de neutralisações do grupo, mesmo quando se usam diluições altas de um virus em presença de sôro hiperimune de outro tipo.

Como conclusão, pelas provas de sôro-neutralisação, o virus brasileiro se comporta como um virus leste típico.

Êsses resultados, no entanto, não destroem as conclusões e os resultados das provas de imunidade tissular, mais completas, jogando com outros fatôres de imunidade que a sôro-neutralisação não permite surpreender. Pensamos que as diferenças de poder antigênico da amostra brasileira em relação ao virus leste típico devem prevalecer e que o virus brasileiro deverá ser classificado como uma variedade do tipo leste, uma vez que não lhe é totalmente idêntico. Cabe recordar aqui que outras diferenças existem, como período de incubação e de evolução na cobaia, assim como de poder infectante para outras espécies, como o coelho, e mesmo para a cobaia adulta por vias periféricas. Diferenças em linhas gerais mais ou menos semelhantes, relativas ao poder antigênico, são assinaladas, recentemente, por CASALS e WEBSTER (9) no estudo comparado do virus do "louping-ill" do carneiro com o virus da encefalite humana da Rússia.

Os resultados dessas provas de sôro-neutralisação estão de acôrdo com os de LENNETTE e FOX (25) em sôros de cavalos de Peçanha, em Minas Gerais, e os de CUNHA (13), em sôros de cavalos do Nordeste Brasileiro; êles indicam a predominância, pelo menos atual, do tipo leste no Brasil, pois do ponto de vista sorológico, como vimos, a identidade é completa. Uma vez que a prova sorológica não permite surpreender diferenças, assinaladas apenas pelas provas de imunidade ativa, resta agora saber se predomina no país o tipo leste típico, com tôdas suas características de maior gravidade nas epizootias e de maior ação patogênica, mais alta mortalidade na doença natural, ou se predomina uma variedade do tipo idêntica à que estudamos aqui em São Paulo. Neste último caso, a classificação de variedade de tipo leste adquire sem dúvida um aspecto de maior importância.

O isolamento de novas amostras de virus no País, e seu estudo pelas provas de imunidade tissular deverão para o futuro esclarecer esta questão. Não constitue detalhe secundário o esclarecimento dêsse aspecto, nem o seu interêsse seria apenas experimental.

Se predominar no país o virus leste típico, com tôdas as suas características de patogenicidade, imunológicas e de gravidade das epizootias, é necessário que a vacinação no campo seja sempre realisada com vacina da amostra leste típica, que como vimos vacina contra o virus brasileiro. Em razão do alto poder patogênico do virus leste e em face das nossas experiências relatadas no trabalho anterior, a imunidade sólida contra êste virus parece que não se alcança sempre com duas doses subcutâneas na cobaia, contra provas de infecção realisadas por via cerebral, embora as vacinações praticadas no campo não requeiram uma imunidade tão sólida. Além disso, os ensaios de SCHOENING mostram que a imunidade para o tipo leste cai mais depressa e não parece tão durável quanto a do oeste.

Se predominarem no país amostras idênticas ou aproximadas da amostra brasileira, a vacinação poderá ser de preferência realisada com esta amostra, que como vimos tem poder antigênico sólido, regular e durável, conforme numerosos testes realisados (7).

Como se vê, se as provas sorológicas têm o seu inegável interêsse, elas não devem substituir totalmente a importância das provas de imunidade tissular, nem diminuir a grande utilidade destas.

A solução futura dessas questões só poderá ser fornecida pelo isolamento de novas amostras brasileiras e pelo seu estudo imunológico completo, do ponto de vista sorológico e tissular.

Além disso, convém não esquecer que as provas de sôro-neutralisação só têm interêsse e valor específico nas regiões onde as vacinações não foram ainda realisadas. Uma vez que vacinações, embora em escala relativamente reduzida, já estão sendo feitas no Brasil, é necessário que as provas de sôro-neutralisação sejam consideradas como de valor específico de tipo, no caso do cavalo, em efetivos que não sofreram vacinações.

Estas considerações mostram a atenção que deverão continuar merecendo o isolamento de novas amostras, assim como a caracterisação clínica completa e segura dos fócos específicos no nosso meio, e o estudo completo pelas provas cruzadas dos novos virus isolados.

No trabalho de isolamento de novas amostras, que não é em geral fácil, autópsias em série, quando possível, não devem ser perdidas, para evitar as causas de insucesso.

No trabalho de caracterisação clínica das epizootias devem ser considerados os fatôres importantes que temos assinalado em publicações anteriores. Insistimos em que, com os dados numerosos que a literatura possue, adaptados à situação do nosso meio, é possível realisar a caracterisação clínica segura das epizootias baseada nesses dados, afastando com segurança outras doenças de quadro clínico semelhante, em linhas gerais, mas não idêntico, com distúrbios nervosos.

No estudo imunológico, é necessário realisar as provas de imunidade ativa e passiva.

Se se considera a enorme extensão do País, a existência do virus oeste na Argentina, e do venezuelano na Venezuela, na Colombia e na ilha de Trinidad, deve-se supor que os estudos futuros devem revelar entre nós os três tipos clássicos da doença americana, dadas as largas faixas de fronteira e as possibilidades de disseminação que se podem prever diante dos estudos epidemiológicos recentes em torno dos vectores e dos portadores de virus na natureza.

CONCLUSÕES

A amostra brasileira do virus da encefalomielite infecciosa do cavalo, que isolamos em São Paulo, classificada pelas provas de imunidade ativa cruzada, como uma variedade do tipo leste, quando inoculada em cobaias de 300 grs. por via subcutânea, muscular e peritoneal, assim como no camondongo suiço albino de 30-40 dias, fornece, em geral, resultados negativos. Alguns resultados positivos, mas inconstantes, são obtidos com virus de cérebro de camondongo.

Na cobaia nova de 15 dias, 180-200 grs., os resultados são mais satisfatórios pelas três vias acima referidas.

No camondongo novo, de 17 dias, o virus é sempre infectante por via subcutânea, muscular e peritoneal. A DLM por via peritoneal alcança 10^{-5} - 10^{-6}.

Estudo comparado de inoculação de misturas virus-sôro por via cerebral e peritoneal, na cobaia adulta e no camondongo novo, mostram a grande superioridade da técnica peritoneal, que neutralisa pelo menos, cêrca de 1.000 DLM mais que a técnica cerebral.

Sôros neutralisantes de alto teor de anticorpos são obtidos no coelho com 3-4 inoculações de vacinas formoladas de embrião de pinto.

A técnica peritoneal no estudo dos anticorpos neutralisantes, fixada por OLITSKY e HARFORD para o virus oeste e leste, pode ser estendida ao virus venezuelano e à amostra brasileira.

Experiências de sôro-neutralisação cruzada foram realisadas tratando o virus brasileiro por sôros hiperimunes leste, oeste e vene-

zuelano, e do mesmo modo tratando os virus leste, oeste e venezuelano por um sôro de amostra brasileira.

O sôro leste neutralisa regularmente o virus brasileiro em tôdas as diluições ensaiadas, e do mesmo modo o sôro brasileiro neutralisa sempre o virus leste em tôdas as diluições ensaiadas. Êste resultado é demonstrativo de uma identidade sorológica completa, e nenhuma diferença parece existir por meio das provas de sôro-neutralisação cruzada. As diferenças de poder antigênico das vacinas de virus brasileiro em relação ao virus leste, assinaladas em nosso trabalho anterior, aqui não se verificam: um sôro brasileiro neutralisa o virus leste do mesmo modo que o faz o sôro leste.

Não há, como se devia prever, qualquer relação sorológica da amostra brasileira com o tipo oeste ou com o venezuelano, o que confirma e completa as conclusões do nosso trabalho anterior. Não se verifica mesmo qualquer indício de neutralisação de grupo, quando sôros hiperimunes de um tipo são colocados em presença de diluições altas dos outros tipos. A sôro-neutralisação é rigorosamente específica de tipo.

Pensamos que as diferenças de poder antigênico e de patogenicidade da amostra brasileira em relação ao tipo leste devem assim mesmo prevalecer, e que ela deve ser classificada como uma variedade de leste, uma vez que não lhe é totalmente idêntico.

Se outras amostras isoladas no país se revelarem leste típicas, as diferenças assinaladas no caso de nossa amostra terão um interêsse mais restrito; mas se outras amostras isoladas revelarem as mesmas diferenças de poder antigênico e de patogenicidade constantes, o fato terá sem dúvida um caráter de constância e será de especial interêsse.

IMMUNOLOGICAL RELATIONSHIPS BETWEEN THE BRAZILIAN AND THE AMERICAN VIRUSES OF EQUINE ENCEPHALOMYELITIS, THROUGH CROSS-NEUTRALISATION TESTS

Abstract

The behaviour of the Brazilian virus of equine encephalomyelitis we isolated in S. Paulo is studied in comparison with the types known, through cross-neutralization tests. This series of experiments is a complement to the previous experiments on cross tissue immunity in which the Brazilian virus was classified as a variety of the eastern type.

A rapid review of the question of the neutralizing antibodies of the virus is presented.

Comparative experiments with the tecnique of inoculation of the mixtures virus-serum by intracerebral route in the guinea-pig and by intraperitoneal route in young Swiss albino mice, show great superiority of the peritoneal tecnique of Olitsky and Harford. This tecnique may be extended to the study of the Venezuelan virus and to the Brazilian virus, the pathogenic action of which is less intense than that of the typical eastern one.

From the humoral point of view the Brazilian strain behaves like a typical eastern virus. An eastern serum neutralizes the Brazilian virus in the same way it neutralizes the corresponding eastern virus. This result agrees with the previous cross protection experiments, in which the eastern vaccine offered regular protection against the Brazilian virus.

Furthermore, the Brazilian serum always neutralizes the eastern virus in the same way it did to the eastern serum. A result as regular as that was not to be foreseen, since the Brazilian vaccine gives but incomplete and irregular protection against the eastern virus.

The complementary experiments of cross-neutralization of Brazilian serum in the presence of the western virus and of the Venezuelan virus on one side and of western and Venezuelan serums in the presence of Brazilian virus on the other side, show the absence of any immunological relationship.

The results of these tests should not invalidate those yielded by the tissue immunity tests, which are more complete and disclose differences which the serum-neutralization does not allow to detect. The differences in the antigenic power of the Brazilian strain and of the eastern virus, which proved constant, ought to prevail and the Brazilian strain, since it is not a typical eastern virus, should be considered as a variety of the eastern type.

It remains to be investigated whether in this country the typical eastern virus with all its characters of severity in epizoötics, as higher mortality rate, shorter period of incubation and more pronounced pathogenic action, does predominate or whether there predominates a variety of the eastern type identical with that isolated in S. Paulo. In the latter case the classification of a variety of the eastern type increases itself in importance.

The isolation of new samples and their complete immunologic study should clear this question. The cross tissue immunity tests are then indispensable for the establishment of differences in the antigenic power.

BIBLIOGRAFIA

1 — BEAUDETTE, F. R. — 1939 — Equine encephalomyelitis in avian hosts. *Proc. 43th. Ann. Meet. of the U. S. Livestock San. Ass.*, Chicago, Ill., p. 185-201.

2 — BEAUDETTE, F. R., J. BLACK and C. B. HUDSON — 1941 — Another case of eq. encephalomyelitis in New Jersey Pheasants. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 98: 449-450.

3 — BURNET, F. M. and I. A. GALLOWAY — 1934 — The propagation of the virus of vesicular stomatitis in the chorioallantoic membrane of the developing Hens Egg. *British J. Exp. Path.*, 15: 105.

4 — CARNEIRO, V. — 1937 — A encefalomielite infecciosa dos equideos no Brasil. *Arq. Inst. Biol.*, S. Paulo, 8: 115-134.

5 — CARNEIRO, V. — 1939 — Equine encephalomyelitis in Brazil. *Proc. Sixth Pacific Sc. Congress*, 5: 251-258.

6 — CARNEIRO, V. — 1941 — A doença de Aujeszky em suinos no Brasil, nos focos de epizootias em bovinos, pela pesquisa de anticorpos neutralisantes do virus. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 12: 243-281.

7 — CARNEIRO, V. e R. CUNHA — 1943 — Estudos sôbre a encefalomielite infecciosa dos equídeos no Brasil. *Arq. Inst. Biol.*, S. Paulo, 14: 157-194.

8 — CASALS, J. — 1943 — Neutralising and complement-fixing antibodies and resistance following vaccination in experimental encephalitis infection. *J. Exp. Med.*, 78: 447-463.

9 — CASALS, J. and L. T. WEBSTER — 1944 — Relationship of the virus of loupin-ill in sheep and the virus of Russian spring-summer encephalitis in man. *J. Exp. Med.*, 79: 45-63.

10 — COX, H. and P. OLITSKY — 1936 — Active immunisation of guinea pigs with the virus of eq. encephalomyelits. II — Imm. with formolised virus. *J. Exp. Med.*, 63: 745-767.

11 — COX, H. and P. OLITSKY — 1936 — III — Quantitative studies of serum antiviral bodies in animals immunised with active or inactive virus. *J. Exp. Med.*, 64: 217-222.

12 — COX, H. and P. OLITSKY — 1936 — IV — Effect of immune serum on antigenicity of active and inactive virus. *J. Exp. Medr.*, 64: 223-232.

13 — CUNHA, R. — 1943 — Anticorpos para o virus este da encefalomielite equina em sôros de cavalos no Nordeste Brasileiro. *Rev. Bras. Biol.*, 3: 425-430.

14 — FRIEDMANN, V., A. HOLLANDER and S. BORNSTEIN — 1944 — Studies on virus immunity. *J. Imm.*, 48: 247-257.

15 — GILTNER, L. T. and M. S. SHAHAN — 1933 — The immunological relationship of eastern and western strains of encephalomyelitis virus. *Science*, 78: 587-588.

16 — GILTNER, L. T. and M. S. SHAHAN — 1936 — The present status of infectious eq. encephalomyelitis in the United States. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 88: 363-374.

17 — HIGBIE, E. and B. HOWITT — 1935 — The behavior of the virus equine encephalomyelitis on the chorioallantoic membrane of the developing chick. *J. Bact.*, 29: 399-406.

18 — HOWITT, B. — 1932 — Equine encephalomyelitis. *J. Infectiones Dis.*, 51: 493-510.

19 — Howitt, B. — 1934 — Certaines properties of the virus of equine encephalomyelitis. *J. Infect. Dis.*, 55: 138-149.

20 — Howitt, B. — 1935 — An immunological study in laboratory animals of thirteen different strains of equine encephalomyelitis. *J. Imm.*, 29: 319-341.

21 — Howitt, B. — 1941 — Development of neutralising antibodies to the virus of equine encephalomyelitis and St. Louis encephalitis strain in the blood and cerebrospinal fluid of man and animals together with recovery of the St. Louis v. from the blood of monkeys. *J. Imm.*, 42: 117-131.

22 — Huang, C. H. — 1943 — Further studies on the titration and neutralisation of the virus of western strain of equine encephalomyelitis virus in tissue culture. *J. Exp. Med.*, 78: 111-126.

23 — Hurst, E. W. — 1936 — Infection of the reshus monkey — macaca mulatta — and the guinea pig with the virus of equine encephalomyelitis. *J. Path. Bact.*, 42: 271-302.

24 — King, L. 1940 — Studies on eastern equine encephalomyelits. IV — Infection in the mouse with fresh and fixed virus. *J. Exp. Med.*, 71: 95-106.

25 — Lennette, E. e J. Fox — 1943 — Anticorpos neutralisantes para a amostra leste do virus da encefalomielite equina em equideos do Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, 38: 85-92.

26 — Merril, M. H. — 1936 — Quantitative studies on the neutralisation of equine encephalimyelitis virus by immune serum. *J. Imm.*, 30: 185-192.

27 — Meyer, K. F., C. M. Harring and B. Howitt — 1931 — The etiology of epizootic encephalomyelitis of horses in the San Joaquin Valley, 1930. *Science*, 74: 227-228.

28 — Morgan, I. — 1941 — Influence of age on susceptibility and immune reponse of mice to eastern equine encephalomyelits virus. *J. Exp. Med.*, 74: 115-132.

29 — Morgan, I. and P. Olitsky — 1941 — Immune reponse of mice to active virus and to formolised-inactived virus of eastern equine encephalomyelitis. *J. Imm.*, 42: 445-454.

30 — Morgan, I., R. W. Schlesinger and P. Olitsky — 1942 — Induced resistance of the c. n. system to experimental infection with equine encephalomyelitis virus. *J. Exp. Med.*, 76: 357-369.

31 — Olitsky, P., H. R. Cox and J. Syverton — 1934 — Comparative studies on the virus of vesicular stomatitis and equine encephalomyelitis. *J. Exp. Med.*, 59: 159-171.

32 — Olitsky, P. and C. G. Harford — 1938 — Intraperitoneal and intracerebral routes in serum protection tests with the virus of equine encephalomyelitis. *J. Exp. Med.*, 68: 173-189.

33 — Olitsky, P. and C. G. Harford — 1938 — Idem, II. *J. Exp. Med.*, 68: 761-777.

34 — Olitsky, P. and C. G. Harford — 1938 — Idem, III. *J. Exp. Med.*, 68: 779-787.

35 — Olitsky, P. and I. Morgan — 1939 — Studies on active and passive immunity resulting from inoculations of formolised inactivated and active virus of equine encephalomyelitis. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 95: 530-533.

36 — Sabin and P. Olitsky — 1938 — Studies of equine encephalomyelitis viruses. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 38: 595-597.

37 — SHAHAN, M. S. and L. T. GILTNER — 1935 — Experimental studies on equine encephalomyelitis formolised tissue vaccine. *The North Am. Vet.*, **16**: 18-26.

38 — TEN BROECK, C., E. W. HURST and E. TRAUB — 1935 — Epidemiology of equine encephalomyelitis in the eastern United States. *J. Exp. Med.*, **62**: 677-685.

39 — TEN BROECK, C. and M. H. MERRILL — 1933 — A serological difference between eastern and western equine encephalomyelitis virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, **31**: 217-220.

40 — WRIGHT, F. H. — 1942 — Antibodies in human serum which neutralise the virus of equine encephalomyelitis. *The Am. J. of Hyg.*, **36**: 57-67.

Vol. 15 — Art. 14 Dezembro de 1944

MORFOLOGIA EXTERNA E ANÁLISE DOS CARACTERES TAXONÔMICOS DE "PYCNOCHERNES EIDMANNI BEIER, 1935" (CHELONETHIDA: CHERNETIDAE), DAS PANELAS DE LIXO DOS FORMIGUEIROS DE "ATTA SEXDENS RUBROPILOSA FOREL, 1908"

POR

C. Pereira e M. P. de Castro

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com 29 figuras no texto

INTRODUÇÃO

O presente trabalho é o primeiro de uma série em elaboração, na qual está sendo feito um estudo pormenorizado da fauna acarológica das "panelas de lixo" dos sauveiros. Entretanto, justamente o trabalho inicial não é de acarologia, como os que se seguirão, pois gira em torno do melhor conhecimento de um interessante quernetídeo, já encontrado anteriormente, no mesmo ambiente, em Mendes, Estado do Rio, por EIDMANN, e descrito sumariamente por BEIER em 1935, baseado em um único exemplar macho.

Neste trabalho faz-se um estudo minucioso da morfologia externa de *Pycnochernes eidmanni* BEIER, 1935, cujo conhecimento é tornado mais amplo; aproveitando a abundância de material e sua provavel homogeneidade genética, resolvemos submeter à análise estatística a variação no número de dentes da quela nesta espécie, que é um dos caracteres utilizados na sua identificação. Agradecemos a P. E. VANZOLINI e V. ROSSETTI a orientação no tratamento estatístico do material.

MATERIAL E MÉTODOS

Os exemplares estudados são parte da população colhida num formigueiro experimental de *Atta sexdens rubropilosa* FOREL, de 8 anos de idade, instalado no seu campo experimental, no Instituto Biológico, por M. AUTUORI, a quem agradecemos o interessante material.

Uma parte deste foi fixada em líquido de Pampel e outra mantida viva em câmaras úmidas, para o estudo do ciclo evolutivo e segura caracterização dos diferentes estádios.

Na análise das lirifissuras, das cerdas, da textura do revestimento cutâneo e das genitálias, revelou-se preciosa a técnica de impreg-

nação argêntica de PEREIRA & CASTRO (1943), embora os resultados fossem menos interessantes no estudo das quelas, devido ao seu alto grau de esclerosamento; por este motivo o seu estudo foi realizado em exemplares montados em meio de Faure, depois de tratados a quente pela potassa a 10%.

Todos os desenhos foram feitos em câmara clara.

As medidas da carapaça foram tomadas em material dissecado, o que elimina o erro na determinação de sua largura, inevitavel quando se mede no exemplar em toto-montagem.

As dimensões que damos seguem o padrão de medidas adotado por CHAMBERLIN (1931).

DESCRIÇÃO

GENERALIDADES — A espécie apresenta as linhas gerais mais comuns da família *Chernetidae*, com os palpos fortes, de artículos atarracados, quelas com dedos não muito desenvolvidos, dente de veneno só no dedo movel, e em ambos os dedos uma fileira de dentes normais e alguns dentes accessórios tanto externa como internamente.

As cerdas do revestimento são finas e curtas na maioria: as da face ventral são singelas e as da dorsal terminam em duas ou três pontas. Nos tergitos e esternitos elas se arranjam ao longo da margem posterior; nos palpos são espalhadas mais ou menos irregularmente, faltando na face de flexão das articulações; na carapaça dispõem-se mais ou menos simetricamente em toda superfície e ao longo da margem posterior. São mais compridas na extremidade posterior do corpo e nas pontas dos dedos. Nos dedos existem tambem cerdas de natureza sensorial, que são mais longas e mais delicadas que as demais.

O tegumento não apresenta esclerosamento muito intenso. As partes mais esclerosadas, que são os palpos e a carapaça, teem côr de caramelo; as quelíceras, as maxilas, as coxas e as pernas são de um pardo-amarelado bem claro, ao passo que o tegumento membranoso interposto entre as partes esclerosadas é completamente branco. O esclerosamento nas ninfas é menos intenso e tambem de menor extensão, fazendo que nestes estádios os tergitos e esternitos sejam divididos ao meio, ficando suas duas metades separadas por uma larga faixa de tegumento membranoso, ao passo que, no adulto, esta separação consiste apenas num discreto fendilhamento.

O comprimento do corpo é muito variavel, principalmente nas fêmeas e nas ninfas (Tab. 1). Nas fêmeas isso resulta do acúmulo de vitelo para alimentação dos embriões no saco ovular, e nas ninfas, da

turgidez que precede a muda. Nos machos a variação parece estar ligada, quasi exclusivamente, ao estado de repleção alimentar, que tambem interfere na variação das ninfas e fêmeas. Todas estas causas de variação mascaram e perturbam a análise da flutuação que possa existir no comprimento real da espécie.

Estas são as dimensões médias que apresentam os diversos estádios, os erros padrões respectivos, e as medidas extremas:

Ninfa de primeiro estádio (n = 8): 0,92 ± 0,04 (0,08 — 1,1 mm).
Ninfa de segundo estádio (n = 3): em torno de 1,3 mm (1,1 — 1,4 mm).
Ninfa de terceiro estádio (n = 30): 1,84 ± 0,1 (1,5 — 2,2 mm).
Fêmea (n = 39): 2,5 ± 0,08 (2,2 — 2,8 mm).
Macho (n = 28): 1,98 ± 0,05 (1,8 — 2,2 mm).

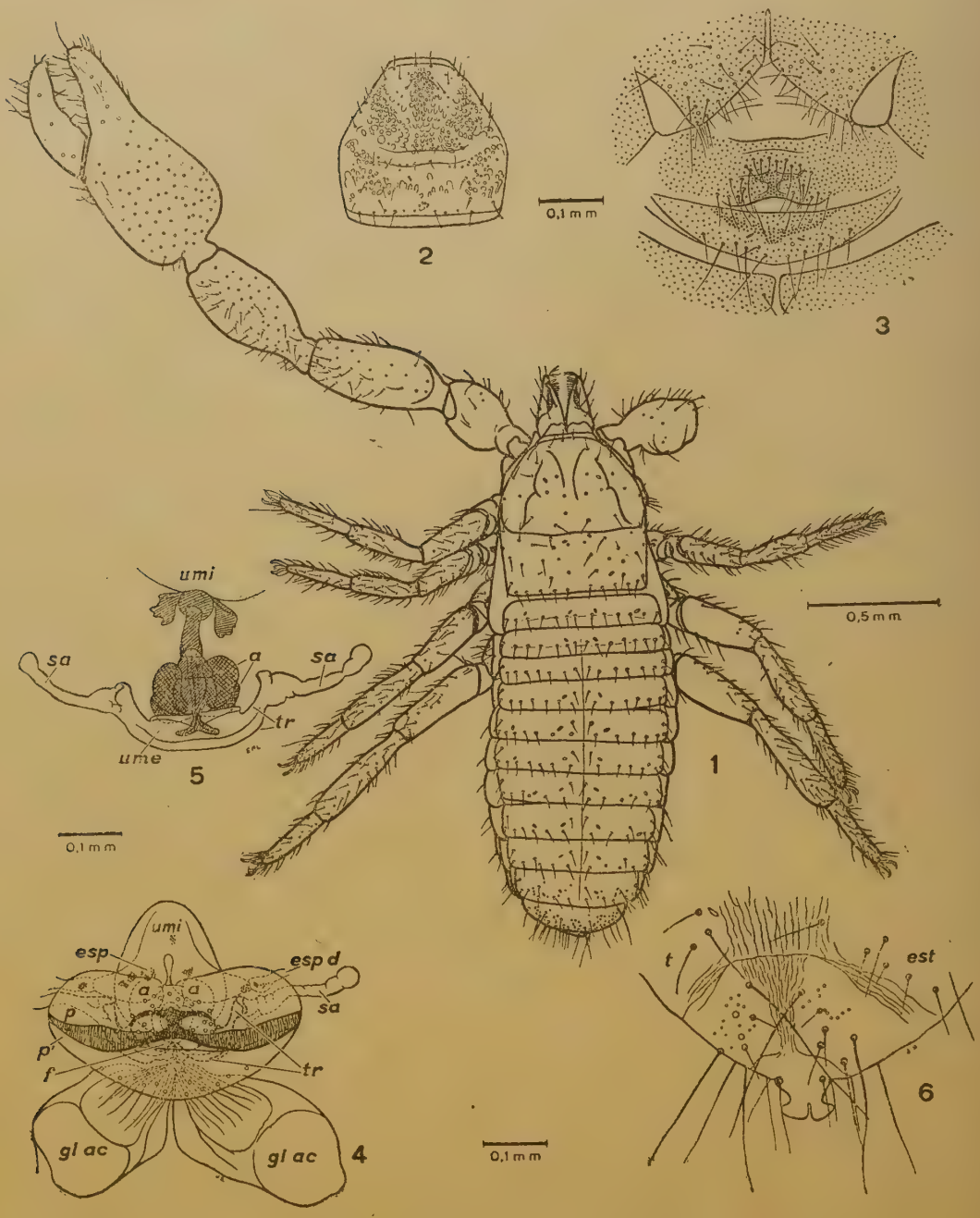
Em seguida daremos a descrição mais pormenorizada dos diversos estádios, no que eles teem de peculiar.

MACHO

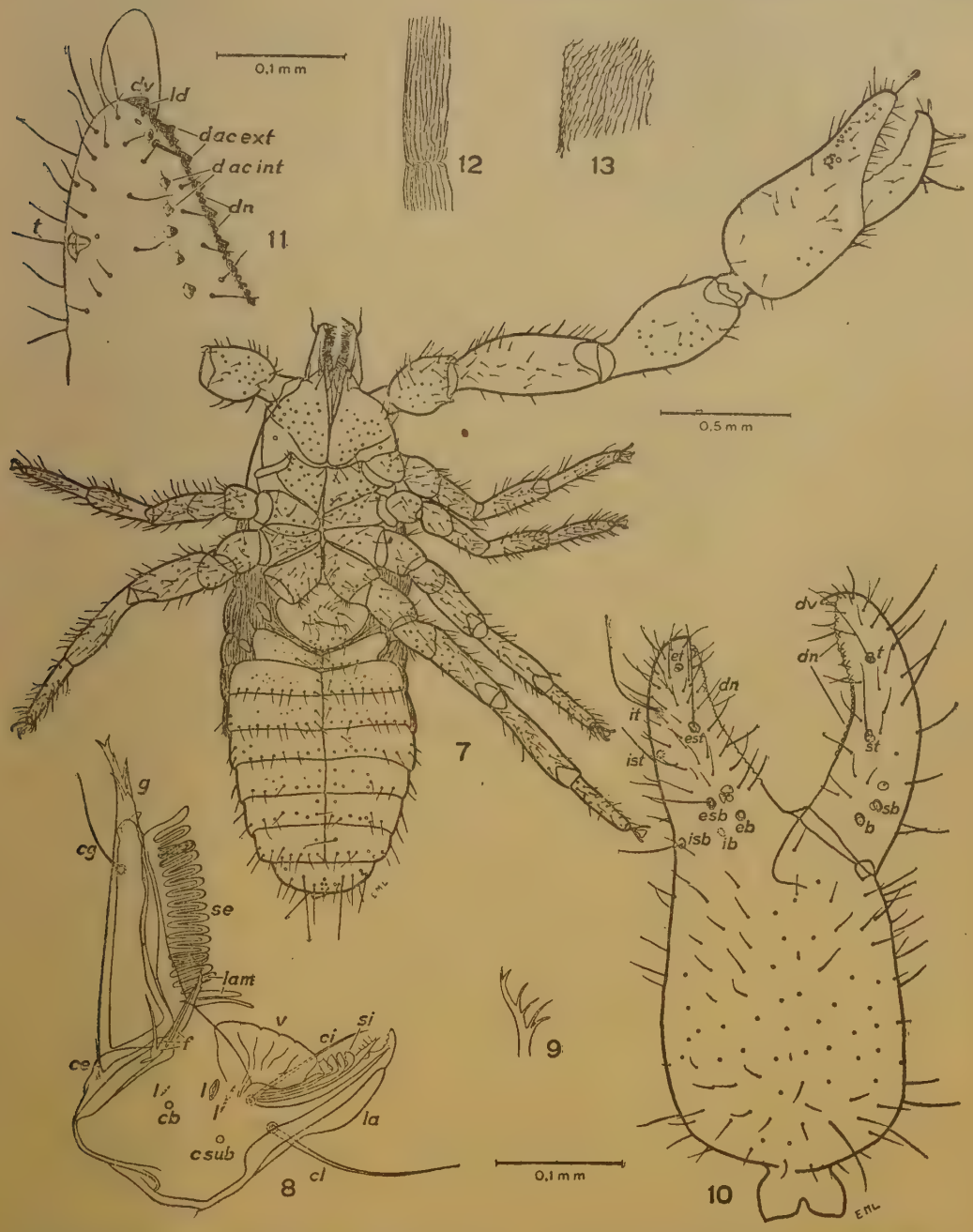
(figs. 1 e 7)

CARAPAÇA (fig. 2) — Mede cerca de 0,626 mm de comprimento por 0,642 mm de maior largura; é de contorno hexagonal, irregular, como se fosse constituida por um retângulo posterior, encimado por um trapézio anterior, nele apoiado pela base; os lados da porção trapezoidal divergem um do outro cerca de 70°; estas duas porções da carapaça são separadas por um relêvo transversal ligeiramente sinuoso, apresentando uma concavidade medial anterior, ladeada por duas outras laterais posteriores; esse relêvo é deprimido externamente e espessado internamente. A superfície externa da carapaça apresenta fina escultura em baixo relevo, que lhe confere aspecto rendilhado, e tende a atenuar-se tanto junto ao rebordo como nas proximidades do sulco transversal. Não tem olhos nem manchas ocelares. E' revestida de cerdas curtas e grossas, terminadas em duas a quatro pontas; o número das cerdas marginais tende a ser 4 no rebordo anterior e 10 no posterior, sujeito às modificações decorrentes da variabilidade dos seus pontos de implantação.

TERGITOS — Teem superfície ligeiramente escamosa, contorno retangular, com as seguintes dimensões: 1.° — 0,098 mm de altura x 0,575 mm de largura; 2.° — 0,098 x 0,608 mm; 3.° — 0,090 x 0,624 mm; 4.° e 5.° — 0,123 x 0,633 mm; 6.° — 0,123 x 0,649 mm; 7.° — 0,127 x 0,608 mm; 8.° — 0,127 x 0,559 mm; 9.° — 0,131 x 0,518 mm; 10.° — 0,147 x 0,452 mm; 11.° — 0,107 x 0,369 mm. Os 1.°, 2.°, 10.° e 11.° são inteiriços, ao passo que todos os outros são fendilhados na linha mediana, o que os divide em duas metades simétricas e justapostas.



Pycnochernes eidmanni BEIER: Macho. Fig. 1 — face dorsal; fig. 2 — carapaça; fig. 3 — genitalia externa; figs. 4 e 5 — genitalia interna; f — fenda genital, *p* e *p'* — placas genitais, *umi* — *uterus masculinus internus*, *a* — asas quitinosas para inserção de músculos, *sa* — sacos aéreos, *esp d* — ductos seminais, *esp* — espermatozoides, *gl ac* — glândulas accessórias, *tr* — traves esclerosadas da parede do *uterus masculinus externus*, *ume* — *uterus masculinus externus;* fig. 6 — anália (em perfil) *t* — tergitos, *est* — esternitos.



Pycnochernes eidmanni BEIER: Macho. Fig. 7 — face ventral; fig. 8 — quelícera: *g* — gálea, *f* — *flagellum*, *l* — lirifissuras, *se* — sérrula exterior, *si* — sérrula interior, *lam* — lamelas da sérrula, *la* — lâmina, *v* — *vellum*, *cg* — cerda galeal, *cl* — cerda laminal, *c sub* — cerda sub-basal, *cb* — cerda basal, *ci* — cerda interior, *ce* — cerda exterior; fig. 9 — gálea; fig. 10 — quela, face externa: *et it t* — cerdas tacteis terminais, *est ist st* — cerdas tactis subterminais, *esb isb sb* — cerdas tacteis sub-basais, *eb ib b* — cerdas tácteis basais, *dn* — dentes normais, *dv* — dente de veneno; fig. 11 — ponta do dedo fixo esquerdo: *dn* — dentes normais, *t* — pêlo tactil terminal, *ld* — *lâmina defensor*, *dv* — dente de veneno do dedo fixo, *d ac int* — dentes accessórios internos, *d ac ext* — dentes accessórios externos; fig. 12 — membrana pleural abdominal; fig. 13 — membrana pleural cefalotoráxica.

As cerdas são do mesmo tipo que as da carapaça, embora as do 10.º e 11.º tergitos sejam bem mais longas, podendo alcançar mesmo o dobro das dimensões das dos outros tergitos. Cada tergito tende a exibir 12 cerdas marginais posteriores, sendo tal número frequentemente alterado pelo deslocamento que podem sofrer seus pontos de implantação. Tende a haver 4 lirifissuras, sendo duas justamedianas e duas justalaterais, embora este número frequentemente se reduza pela falta ocasional de uma ou outra lirifissura, num ou noutro tergito. Os tergitos 1.º a 9.º não teem microlirifissuras, que vão ser encontradas em número de 12 a 13 no 10.º e de 40 a 43 no 11.º.

ESTERNITOS — Superfície tambem ligeiramente escamosa. Os 3 primeiros concorrem à formação da genitália. Os esternitos 4.º a 10.º são fendilhados na linha mediana, o 11.º, íntegro. O 4.º mede 0,057 mm de altura x 0,509 mm de largura; tem as duas metades simétricas, com a forma de asas anteriores de traça. O contorno dos 5.º ao 11.º é retangular, sendo suas alturas e larguras respectivamente 5.º — 0,098 x 0,649 mm, 6.º e 7.º — 0,110 x 0,690 mm, 8.º — 0,131 x 0,641 mm, 9.º — 0,131 x 0,591 mm, 10.º — 0,131 x 0,517 mm, 11.º — 0,107 x 0,386 mm. Suas cerdas são simples, ponteagudas e sensivelmente mais longas que as dorsais. O número das cerdas marginais posteriores tende a ser de 8 no 4.º esternito, agrupadas no seu terço médio, ao passo que nos 5.º a 11.º elas se distribuem ao longo da margem posterior, em número de 18 a 20, sujeito às mesmas variações já assinaladas a propósito dos tergitos.

As lirifissuras dos esternitos 5.º a 10.º teem número, situação e variabilidade semelhantes às dos tergitos correspondentes, enquanto o 11.º possue apenas um par situado justalateralmente. As microlirifissuras variam de 9 a 12 nos 5.º e 6.º esternitos, de 7 a 9 nos 7.º e 8.º, de 3 a 5 nos 9.º e 10.º e de 30 a 32 no 11.º.

GENITÁLIA EXTERNA (fig. 3) — E' uma peça constituida pela coalescência dos 3 primeiros esternitos, contendo a fenda genital, transversalmente, na sua parte média. O opérculo anterior é fracamente esclerosado, exceto no rebordo arqueado da fenda genital e no terço médio do bordo anterior, de tal maneira que seu contorno é dificilmente perceptivel. Tem um par de lirifissuras dentro dos limites do terço médio de sua largura e na metade de sua altura. As cerdas, do mesmo tipo que as dos esternitos, podem ser distribuidas em vários grupos: 8 cerdas marginais da fenda genital, dispostas em dois grupos de quatro, que deixam um espaço livre aos lados da linha mediana; 8 dispostas em arco entre as lirifissuras; 8 dispostas em dois grupos de quatro, de cada lado, situadas irregularmente entre a lirifissura e as

quatro correspondentes cerdas marginais. Embora tais números sejam sujeitos às modificações já assinaladas a propósito da quetotaxia dos tergitos e dos esternitos, são as cerdas do último grupo as que mais variam. O opérculo posterior é bem esclerosado, lembrando uma valva de concha de ostra, vista de perfil; tem um par de lirifissuras em situação análoga ao do opérculo anterior, com a seguinte distribuição de cerdas: 1 par pouco anteriormente e medialmente às lirifissuras, 1 par pouco posteriormente e medialmente a elas e 10 cerdas dispostas nos dois quartos paramedianos da margem posterior do opérculo.

GENITÁLIA INTERNA (figs. 4 e 5) — Apesar de reservarmos o estudo das partes moles do animal para um trabalho ulterior, resolvemos, para maior clareza, abrir exceção para as da genitália interna que estão imediatamente relacionadas com as peças quitinosas.

A fenda genital dá acesso a uma câmara, alongada transversalmente, de paredes membranosas delicadas, providas de reforços constituidos por traves esclerosadas — o impropriamente denominado "uterus masculinus externus"; cada extremidade lateral desta câmara emite um divertículo membranoso, alongado — os sacos laterais; no assoalho veem desembocar, medianamente, duas glândulas muito volumosas — as glândulas accessórias. Mais profundamente, em situação ântero-dorsal, encontra-se uma segunda câmara de parede membranosa, envolvida por espessa camada muscular, desempenhando as funções de vesícula seminal, e impropriamente denominada "uterus masculinus internus"; é abaulada dorsalmente, apresentando ventralmente duas expansões retortiformes que se ligam aos ductos seminais. Os dois "uteri" são ligados por um tubo membranoso, reforçado externamente por peças fortemente esclerosadas, em número de 4: as duas intermediárias são simples goteiras abertas dorsalmente; a justaposta à câmara externa tem forma de barril, completo na base, abrindo-se porém dorsalmente em direção à peça intermediária mais próxima, apresentando inseridas na sua base 4 asas bem esclerosadas, duas ventrais e duas dorsais; a justaposta à câmara interna é esferoidal, perfurada nos polos, emitindo na altura em que se liga à câmara interna 2 asas fortemente esclerosadas, de situação lateral.

ANÁLIA (fig. 6) — E' uma eminência tubular na extremidade posterior do corpo, resultante da coalescência dos 12.º tergito e esternito, cuja individualidade ainda é assinalada por um par de incisões laterais no rebordo de sua extremidade livre; apresenta dorsalmente um par de cerdas do tipo das dos tergitos, e ventralmente um par do tipo das dos esternitos.

QUELÍCERAS (figs. 8 e 9) — Esclerosamento igual ao dos tergitos e esternitos, apresentando superficialmente as mesmas escamosidades. Teem 0,227 mm de comprimento e 0,107 mm de largura. O dedo movel tem 0,212 mm de comprimento. A sérrula exterior do dedo movel tem 19 lamelas, sendo as duas basais cerca de um terço mais compridas que as demais. A sérrula interior do dedo fixo é, como de costume, formada de seis porções: uma ponta anterior, denteada unilateralmente; quatro lâminas foliáceas com dentes no rebordo externo; uma parte basal, o "vellum", que se abre em leque entre os dedos da quelícera. A ponta do dedo fixo é aguda, recurva e bem esclerosada, como se fosse um dente, e provida de 3 dentinhos dirigidos para trás. Ao longo da face interna do dedo fixo ha quatro pontos de esclerosamento mais forte, formando quatro dentinhos minúsculos. O dedo movel tem terminalmente dois dentes, um bem forte e esclerosado, outro mais fraco e menor. Implantada entre estes dois dentes está a gálea, o órgão fiandeiro do pseudoscorpião, ramificada do seguinte modo: um par de ramos laterais, um par inicial ou basal e dois ramos intermediários, escalonados a distâncias iguais. Neste dedo encontramos em situação subterminal a cerda galeal cujo comprimento não ultrapassa a ponta da gálea.

No corpo da quelícera vamos encontrar as lirifissuras, uma exterior e duas interiores, e as cerdas, que são as seguintes: basal, sub-basal, interior e exterior, e o "flagellum". A sub-basal e a exterior teem a ponta dividida em duas a três pontinhas, ao passo que as outras são simples; o flagelo é constituido de 3 cerdas fortes e engrossadas, as duas menores terminadas em ponta simples e a maior, que é mais distal, com 3 a 4 pontas distais, unilaterais.

MAXILAS — Superfície ventral rendilhada como a carapaça, recoberta por cerdas, na maioria simples, finas e curtas: três delas no processo manducatório e uma nas proximidades do foramen trocanteriano são mais longas e mais fortes; algumas poucas, lateralmente, terminam em duas ou três pontinhas. Ha dois órgãos liriformes, um justamedial, outro colocado no "post-clivus", ambos formados de três a quatro lirifissuras imbricadas, com contôrno quasi circular no primeiro caso e circular no segundo.

Cada maxila tem 0,369 mm de comprimento × 0,255 mm de largura, e 0,320 mm de comprimento accessório × 0,275 mm de largura accessória. Os foramens trocanterianos teem 0,213 mm de diâmetro.

A porção acima descrita constitue a face ventral ou externa da maxila ou, ainda, a área maxilar externa, que se continua, envolvendo

o bicho lateralmente e penetrando por baixo da carapaça, para constituir a face dorsal da maxila. Apresenta aí e lateralmente uma superfície escamosa, que é mais acentuada lateralmente; posteriormente apresenta também um discreto rendilhamento. Anterolateralmente ficam situados os foramens trocanterianos, que medem 0,213 mm de diâmetro, possuindo um côndilo de implantação dorsal, que se articula com o trocânter palpal. Entre as faces dorsal e ventral ha formação de um arcabouço quitinoso que constitue a base de implantação para o aparelho bucal sugador.

PALPOS — Constituem a parte mais esclerosada do corpo. Seus artículos são atarracados e teem a superfície áspera, ora escamosa ora granulosa; estas asperesas são mais acentuadas no pedúnculo das quelas e nas mãos; nos outros artículos é muito ligeira, havendo em alguns pontos reticulações semelhantes às da carapaça, mas não tão acentuadas. As cerdas de revestimento são curtas e finas, predominantemente do tipo dorsal; as internas das quelas e as das pontas dos dedos são simples, do tipo ventral; as das pontas dos dedos são mais longas, alcançando até o dobro do comprimento das demais.

O trocânter apresenta um processo arredondado e um pedúnculo bem individualizado. O fêmur é também pedunculado e tem a base bem mais larga que a extremidade distal. A tíbia tem sua parte mais larga na região média. A quela (fig. 10) é forte, tem a largura um pouco menor que a altura e os dedos um pouco mais curtos do que a mão. O dedo movel é recurvo, formando um ângulo aproximadamente de 140°, o que impede o fechamento perfeito dos dois dedos. Dente de veneno bem desenvolvido no dedo movel, ao passo que no dedo fixo (fig. 11) está reduzido ao que parece um grande dente accessório; este, conjugado com uma depressão, dá origem ao "receptor venedentis", não muito acentuado. Nas extremidades de ambos os dedos, em relação com o dente terminal, ha uma lâmina a maneira de cerda — "lâmina defensor". Também em ambos os dedos, inserida na cumieira cortante, existe uma fileira de dentes em número variável, e dos dois lados desta fileira, sem nenhuma regularidade, raros dentes accessórios, cujo número também é variável. Implantam-se também nos dois dedos as cerdas tácteis, que se apresentam na seguinte disposição característica: dedo movel — *sb* e *b* bem próximas; *st* e *t* afastadas; *st* a igual distância de *sb* e *t; st, sb* e *t* dispostas em linha reta; dedo fixo — na face externa a mesma disposição das cerdas do dedo movel — na face interna, *st* próximo de *t*, não a igual distância de *sb; sb* próximo de *b;* as distâncias *sb-b* e *st-t* iguais; *sb, st* e *t* em linha reta.

Existem também as manchas sensoriais, que se localizam na base dos dedos; no dedo movel ha um pequeno grupo de 5 a 7, que se distribuem irregularmente ao longo do seu ângulo externo; no fixo, em maior número, três entre as cerdas *b* e *sb* externas e um grande aglomerado entre *b* e *sb* internas.

As dimensões dos diversos artículos palpais são: trocânter — 0,353 mm de comprimento máximo, inclusive o pedúnculo, × 0,197 mm de largura ao nivel do processo trocanteriano; fêmur — 0,571 mm de comprimento máximo × 0,193 mm de largura máxima, basal; tíbia — 0,591 × 0,254 mm de largura máxima, medial; quela — 0,875 × 0,349 mm de largura, basal, e × 0,365 mm de altura, também basal; dedo movel — 0,472 mm e o fixo — 0,328 mm de comprimento.

Pernas — São mediocremente espessadas, apresentando a divisão normal dos artículos: coxa, trocânter, fêmur proximal e fêmur distal, tíbia, tarso e pretarso. Êste último é constituido do "*arolium*" e de um par de garras simples. Os tarsos das pernas III e IV teem no seu terço basal uma cerda bem mais longa que as demais, considerada de natureza táctil. As coxas serão versadas separadamente, não só para maior facilidade de descrição como também por que é o usual. As pernas teem superfície suavemente rendilhada em alguns pontos e em outros com uma ligeiríssima escamosidade. As cerdas que as revestem são de dois tipos: as do dorsal, terminadas em duas a três pontas e as do ventral, singelas. Arranjam-se de maneira peculiar as lirifissuras do trocânter e do fêmur, que nos demais artículos se espalham sem ordem. No trocânter I ha dorsalmente três, paralelas, e nos demais quatro, também paralelas. Nos fêmures proximais I e II existem dorsalmente, duas a três, que se imbricam, e nos III e IV duas a três, paralelas. As dimensões são as seguintes: primeiro par: trocânter — 0,139 mm de comprimento × 0,107 mm de largura; fêmur proximal — 0,181 × 0,123 mm; fêmur distal — 0,291 × 0,102 mm; tíbia — 0,300 × 0,077 mm; tarso — 0,300 × 0,049 mm; segundo par: trocânter — 0,148 × 0,073 mm; fêmur proximal — 0,139 × 0,111 mm; fêmur distal — 0,259 × 0,090 mm; tíbia — 0,263 × 0,071 mm; tarso — 0,250 × 0,047 mm; terceiro par: trocânter — 0,197 × 0,143 mm; fêmur proximal — 0,148 × 0,073 mm; fêmur distal — 0,263 × 0,115 mm; tíbia — 0,361 × 0,082 mm; tarso — 0,238 × 0,053 mm; quarto par: trocânter — 0,176 × 0,139 mm; fêmur proximal — 0,189 × 0,123 mm; fêmur distal — 0,378 × 0,131 mm; tíbia — 0,439 × 0,094 mm; tarso — 0,296 × 0,053 mm.

Coxas — Apresentam uma superfície levemente rendilhada e revestida de inúmeras cerdas sigelas e muito delicadas. Pela super-

fície das coxas existem lirifissuras e microlirifissuras. Nas coxas I e II existem sómente microlirifissuras, em número de uma a duas. Nas coxas III e IV existem duas lirifissuras foramenais em cada, uma colocada anteriormente, próximo ao côndilo articular, outra posteriormente; ha cerca de cinco microlirifissuras para a coxa III e oito para a IV. As dimensões são as seguintes: coxa I — 0,164 mm de comprimento × 0,255 mm de largura; coxa II — 0,053 × 0,263 mm de largura; coxa III — 0,024 × 0,221 mm de largura; coxa IV — 0,131 × 0,221 de largura.

MEMBRANAS — Constituem o tegumento flexivel e elástico que liga as peças esclerosadas, sendo geralmente estriado ou, antes, pregueado com maior ou menor regularidade. A membrana pleural abdominal (fig. 12) apresenta-se bem distinta da intersegmental, por ter estriação bem nítida; a membrana pleural cefalotorácica (fig. 13) apresenta, além das estriações, pequenas elevações da cutícula, levemente esclerosadas, que formam pequeninos espinhos.

ESTIGMAS — São em número de quatro, dois para cada lado, e se localizam ao nivel dos quatro primeiros esternitos. Estão colocados sôbre uma placa de contôrno triangular-arredondado. A cada estigma vem ter um grosso tronco traqueal, que se afina na sua proximidade. O tronco anterior é mais desenvolvido, coincidindo com o maior desenvolvimento da placa anterior, que é maior e possue três cerdas; o posterior é mais delgado, sendo sua placa correspondentemente menor e possuindo apenas duas cerdas.

FÊMEA

(fig. 14)

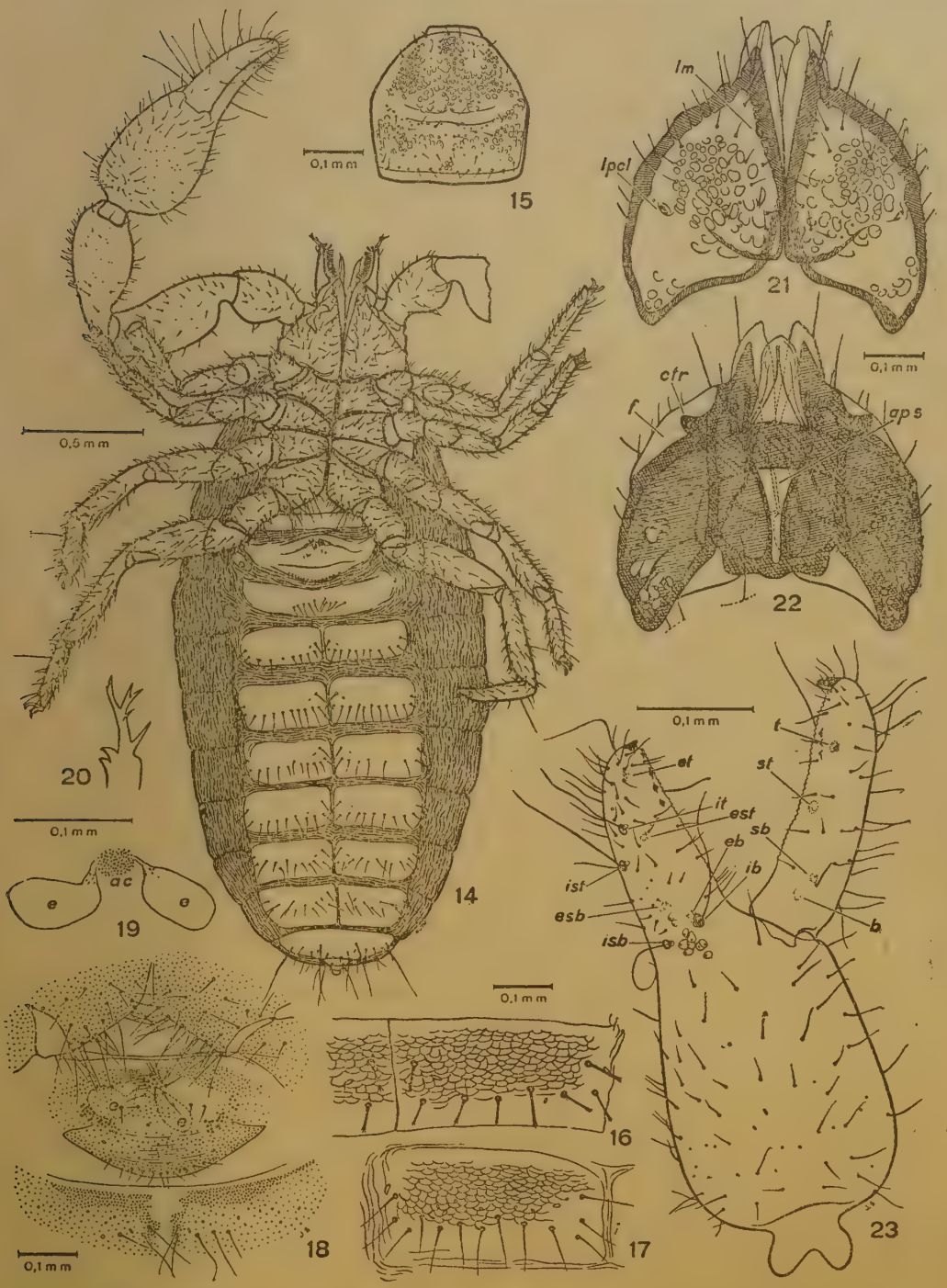
CARAPAÇA (fig. 15) — Tem as dimensões sensivelmente iguais às do macho. Comprimento 0,626 mm × 0,646 mm de largura. O contôrno é um pouco diferente do do macho, pois o sulco transversal é colocado mais anteriormente, e é adiante dêste sulco que os lados convergem para formar a ponta anterior da carapaça; porisso o contôrno da carapaça da fêmea parece mais troncudo que o do macho.

TERGITOS (fig. 16) — Diferem dos do macho não só pelas dimensões como por apresentarem o fendilhamento mais nítido. Sómente o 1.º e o 11.º são inteiriços. Do 1.º ao 3.º, além de 4 lirifissuras como no macho (2 justamedianas e 2 justalaterais), ha tendência para haver mais 4, 2 para cada meio tergito, colocadas entre a justamedial e a justalateral. Nos 4.º ao 9.º ha tendência para haver mais uma entre as duas já existentes. No 10.º ha 4 microlirifissuras, número

êste que vai de 45 a 50 no 11.º. As dimensões são as seguintes: 1.º — 0,131 mm de altura × 0,665 mm de largura; 2.º — 0,156 × 0,707 mm; 3.º — 0,106 × 0,727 mm; 4.º — 0,164 × 0,760 mm; 5.º — 0,189 × 0,764 mm; 6.º — 0,194 × 0,764 mm; 7.º — 0,181 × 0,740 mm; 8.º — 0,181 × 0,706 mm; 9.º — 0,181 × 0,633 mm; 10.º — 0,172 × 0,501 mm; 11.º — 0,127 × 0,419 mm.

ESTERNITOS (fig. 17) — Apresentam, como no macho, superfície ligeiramente escamosa. Os três primeiros formam a genitália. Do 4.º até o 10.º são bipartidos longitudinalmente; do 4.º ao 7.º, as duas metades são bem separadas por uma faixa relativamente larga de tegumento membranoso, ao passo que os seguintes apresentam apenas um fendilhamento igual ao do macho. O 4.º esternito tem contôrno irregular, com 4 a 5 cerdas em cada metade, colocadas próximo da linha mediana; tem cerca de 10 microlirifissuras em cada metade e uma lirifissura, esta próxima da linha mediana e aquelas dispersas irregularmente. No 5.º esternito ha de 9 a 10 cerdas marginais em cada metade, 9 a 10 microlirifissuras e uma lirifissura medial. No 6.º ha cerca de 10 cerdas marginais em cada metade, 5 a 6 microlirifissuras e 1 a 2 lirifissuras mediais e 1 justalateral. No 7.º ha 10 a 12 cerdas marginais em cada meio esternito, 5 a 6 microlirifissuras e 3 lirifissuras, 1 lateral, 1 medial e 1 central. Nos 8.º e 9.º ha de 9 a 10 cerdas marginais e três lirifissuras como no esternito anterior, e 6 a 7 microlirifissuras no 8º e 4 no 9.º, em cada metade. No 10.º, algumas das cerdas marginais parecem estar deslocadas, simulando duas fileiras, uma mais próxima da margem, com 5 cerdas, e outra mais afastada, com 3 a 4 cerdas em cada meio esternito. O 11.º é inteiriço, tem as cerdas mais longas, com pouco mais do dobro do comprimento das outras. Tem um par de lirifissuras e um grande número de microlirifissuras — 40 a 45. Além disso, nos esternitos 5.º a 10.º existe uma cerda justalateral e outra justamedial em cada meio esternito. As dimensões não puderam ser tomadas nos esternitos 4.º, 5.º e 6.º, porque apresentam um contôrno muito irregular e assimétrico. O 7.º tem 0,189 mm de altura × 0,706 mm de largura; o 8.º — 0,172 × 0,674 mm; o 9.º — 0,172 × 0,574 mm; o 10.º — 0,115 × 0,427 mm.

GENITÁLIA EXTERNA (fig. 18) — E' uma peça situada na região correspondente à do macho, ocupando a mesma área e tambem formada pela coalescência dos três primeiros esternitos. Sua forma é dificilmente definivel; acha-se dividida em duas placas, a anterior de contorno irregular e vago, a posterior de contorno bem delimitado, que apresenta um lado côncavo e outro convexo, este dirigido para diante. Entre estas duas placas abre-se a fenda genital. A placa an-



P. eidmanni Beier: Fêmea. Fig. 14 — face ventral; fig. 15 — carapaça; fig. 16 — oitavo tergito; fig. 17 — oitavo esternito; fig. 18 — genitália externa: *e* — espermatecas; fig. 19 — genitália interna: *e* — espermatecas, *a c* — área crivada; fig. 20 — gálea; fig. 21 — maxila, face ventral: *lm* — órgão liriforme mediano, *l p cl* — órgão liriforme do *post-clivus;* fig. 22 — maxila, face dorsal: *ap s* — aparelho sugador, *f* — foramen trocanteriano, *ctr* — côndilo trocanteriano; fig. 23 — quela, face interna: *et it t* — cerdas tácteis terminais, *est ist st* — cerdas tácteis subterminais, *esb isb sb* — cerdas tácteis sub-basais, *eb ib b* — cerdas tácteis basais.

terior tem medialmente uma pequena área circular, onde estão implantadas cerca de 14 cerdas, e onde existem 2 microlirifissuras e 2 lirifissuras; a disposição destes elementos não apresenta simetria alguma. Nas proximidades dos bordos da fenda existem 6 cerdas, 3 de cada lado da linha mediana, cujo número frequentemente sofre redução. A placa posterior apresenta esclerosamento mais regular e tem superfície ligeiramente escamosa. Apresenta 2 microlirifissuras, 1 de cada lado, afastadas do bordo posterior, côncavo, onde se inserem 11 cerdas e 3 lirifissuras. As cerdas da genitália são do tipo ventral, porém menores que as encontradas nos esternitos, com cerca de metade ou terço do seu comprimento.

Genitália Interna (fig. 19) — Não apresenta a complexidade da do macho, nem tem peças muito esclerosadas; a fenda genital comunica-se com uma cavidade — o "uterus" — de parede membranosa; ventralmente esta parede tem uma área crivada, junto à qual veem ter as duas espermatecas.

Anália — Exatamente igual à do macho.

Quelíceras — Em tudo iguais às do macho, com exceção da forma da gálea (fig. 20), que apresenta uma ramificação dicotômica terminal, uma dupla basal e uma única intermediária.

Maxilas — Em tudo iguais às do macho (fig. 21 e 22).

Palpos — Diferem essencialmente dos do macho só no que diz respeito às quelas. Nas fêmeas as quelas são ligeiramente mais delgadas, e os dedos fixo e movel ajustam-se completamente (fig. 23).

Pernas — São iguais às do macho.

Coxas — Apresentam superfície um pouco maior que no macho, principalmente a coxa IV; esta possue um caracter distintivo que é a presença, na sua parte posterior, que está contígua à genitália, de uma série de pêlos bem maiores e mais fortes que os comuns das coxas. As dimensões são as seguintes: coxa I — 0,164 mm de comprimento × 0,271 mm de largura; coxa II — 0,053 × 0,284 mm; coxa III — 0,024 × 0,255 mm; coxa IV — 0,181 × 0,238 mm.

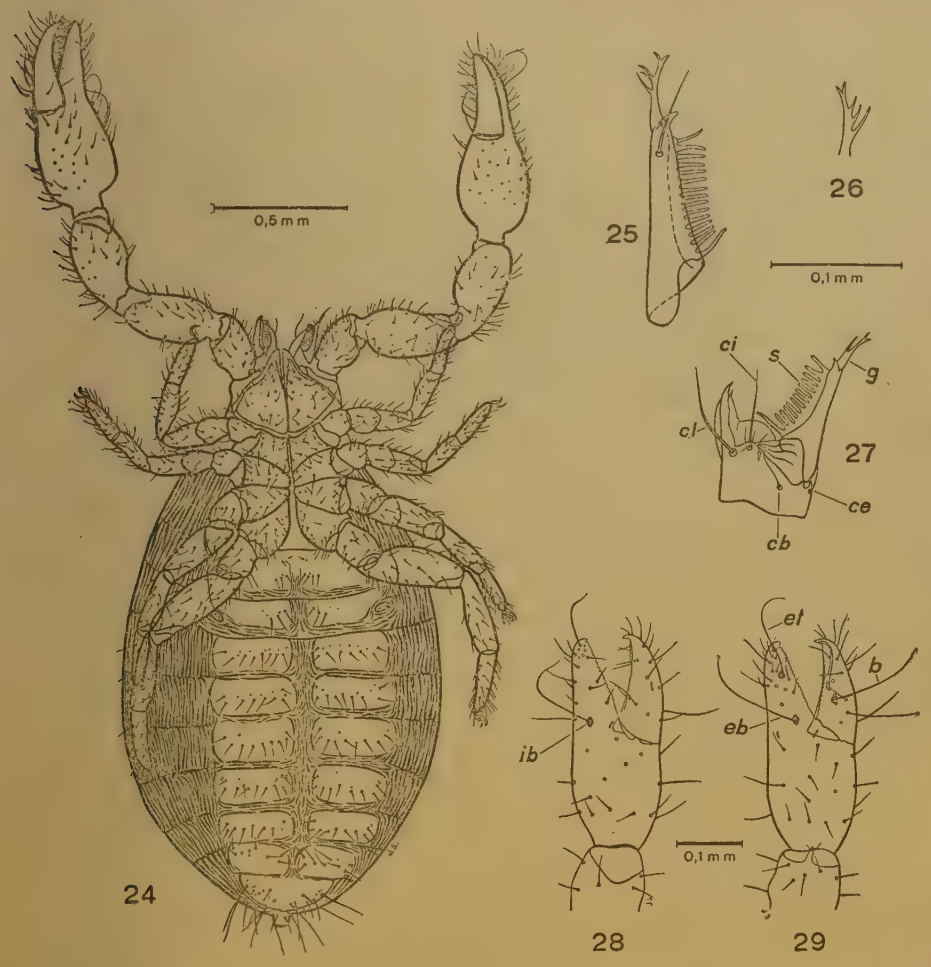
NINFAS

Terceiro Estádio (fig. 24) — Esclerosamento em geral menos intenso que no adulto, mas com a mesma textura nas partes esclerosadas.

As quelíceras são iguais, diferindo apenas nas dimensões e no número de lamelas da sérrula exterior, que é de 17, e também na gálea

que é mais simples.Teem comprimento de 0,182 mm x 0,099 mm de largura, e o dedo movel 0,165 mm de comprimento.

A carapaça não tem sulco transversal, sendo no mais igual à do adulto, com um comprimento 0,534 mm.



P. eidmanni Beier: Fig. 24 — Ninfa III, face ventral; fig. 25 — Ninfa II, dedo movel da quelícera; fig. 26 — Ninfa II, gálea; fig. 27 — Ninfa I, quelícera: *ci* — cerda interior, *cb* — cerda basal, *ce* — cerda exterior, *g* — gálea, *s* — sérrula, *cl* — cerda laminal; fig. 28 — Ninfa I, quela, face interna: *ib* — cerda tactil basal; fig. 29 — Ninfa I, quela, face externa: *et* — cerda tactil terminal, *eb b* — cerdas tacteis basais.

As maxilas e as coxas não apresentam também peculiaridade, tendo as seguintes dimensões: maxila — 0,287 mm de comprimento x 0,205 mm de largura; coxa I — 0,098 x 0,209 mm; coxa II — 0,044 x 0,213 mm; coxa III — 0,016 x 0,205 mm; coxa IV — 0,082 x 0,197 mm.

Os palpos, relativamente ao tamanho do corpo, são menores que no estádio adulto. O trocânter tem 0,230 mm de comprimento x 0,148 mm de largura; o fêmur 0,345 x 0,172 mm; a tíbia 0,378 x 0,197 mm;

a quela 0,657 x 0,255; dedo movel com 0,328 mm de comprimento. As quelas teem número reduzido de cerdas tácteis, sendo 7 no dedo fixo e 3 no movel; parece que faltam a interna do dedo fixo e a externa do movel, para perfazer o número de cerdas do adulto.

Segundo Estádio — O esclerosamento do corpo é muito discreto, pois só as quelas apresentam uma côr pardo-amarelada clara. As quelíceras (fig. 25) teem 15 lamelas na sérrula exterior e 0,186 mm de comprimento x 0,107 mm de largura; o dedo movel tem 0,161 mm. de comprimento. A gálea é mais simples que nos estádios mais adiantados (fig. 26). Os palpos teem as seguintes dimensões: trocânter — 0,164 mm de comprimento x 0,098 mm de largura; fêmur — 0,213 x 0,110 mm; tíbia — 0,213 × 0,123 mm; quela — 0,454 × 0,156 mm. Nas quelas ha 3 cerdas tacteis no dedo movel e 7 no fixo; parece que faltam a *t* interna do fixo e a *t* externa do movel para o número de cerdas do adulto.

Primeiro Estádio — Corpo completamente incolor e as quelas amareladas. As quelíceras (fig. 27) teem 0,095 mm de comprimento x 0,074 mm de largura; o dedo movel tem 0,095 mm de comprimento. A sérrula exterior tem 13 lamelas. No corpo da quelícera faltam as cerdas sub-basal e galeal. Os palpos teem as seguintes dimensões: trocânter — 0,098 mm de comprimento × 0,086 mm de largura; fêmur — 0,164 × 0,094 mm; tíbia — 0,164 × 0,082 mm; quela (figs. 28 e 29) 0,328 × 0,074 mm. Nas quelas ha somente 4 cerdas tácteis, sendo 3 no dedo fixo e 1 no movel. No dedo fixo: *b* e *t* externas e *b* interna; no movel: *b* externa. As cerdas dorsais que nos outros estádios teem as pontas mais ou menos denteadas, são completamente simples neste estádio, tornando-se portanto iguais às ventrais.

VARIABILIDADE

Examinamos lotes de 28 machos, 39 fêmeas, 30 ninfas de terceiro estádio, 3 de segundo e 8 de primeiro, o que nos permitiu estudar a variação de certos caracteres usados na diagnose desta espécie. Assim verificamos a variação no número de cerdas marginais dos tergitos, no número de lirifissuras e no número de dentes das fileiras normal e accessórias das quelas. Verificamos tambem que, num mesmo indivíduo, os lados direito e esquerdo variam independentemente, o que conduz a uma assimetria individual. Alem disso, pudemos observar diferenças entre os diversos estádios, tanto em qualidade como em quantidade, como forma da gálea e número de lamelas da sérrula exterior. Todas essas variações foram abordadas no decorrer da descrição.

TABELA 1

NÚMERO DE DENTES E COMPRIMENTO DO CORPO

MACHO COMP DO CORPO	QUELA DIREITA						QUELA ESQUERDA					
	DEDO FIXO			DEDO MOVEL			DEDO FIXO			DEDO MOVEL		
	NOR.	EXT.	INT.	NOR.	EXT.	INT.	NOR.	EXT.	INT.	NOR.	EXT.	INT.
2,02	36	7	5	39	6	4	34	6	6	38	5	5
2,02	37	7	4	42	5	5	38	6	6	42	5	5
2,11	39	6	5	40	6	5	34	7	6	42	5	5
2,06	37	4	6	38	5	4	37	4	7	35	4	3
1,92	35	6	5	39	5	5	34	8	5	37	4	6
1,92	33	5	7	39	5	5	38	6	5	39	6	3
2,10	36	5	8	37	4	4	35	6	7	35	5	3
1,96	36	7	7	41	4	6	39	6	6	38	6	5
2,02	38	5	5	40	3	7	35	7	5	39	5	5
1,86	37	4	6	40	7	5	36	5	6	44	6	4
2,03	35	6	6	39	5	6	36	7	6	36	6	5
2,00	38	6	5	36	4	5	38	4	5	39	6	5
1,96	38	6	5	37	5	4	36	6	6	41	4	5
1,91	36	5	7	37	5	5	33	6	3	34	5	4
1,96	39	5	6	42	4	5	36	6	6	39	5	5
2,02	33	6	7	36	5	5	31	4	7	29	6	4
1,98	39	5	7	40	5	4	38	6	6	41	4	5
2,24	38	6	6	39	6	5	39	4	7	42	6	4
2,10	34	6	6	36	6	6	34	5	7	34	6	5
2,14	39	5	9	43	5	5	38	6	6	43	6	5
2,12	37	5	6	40	6	5	40	7	5	40	5	5
1,92	37	5	6	36	5	4	33	3	8	36	4	5
1,94	39	5	7	38	6	5	38	6	6	39	7	6
1,94	37	6	5	38	5	5	36	4	7	37	5	5
2,06	33	6	7	39	5	5	33	6	5	37	6	3
2,08	35	4	6	38	6	5	37	6	7	39	5	6
2,18	34	5	6	34	6	5	38	5	6	38	5	5
2,02	39	5	6	42	5	5	39	6	7	43	5	6
FÊMEA												
2,44	34	5	4	37	6	2	33	6	3	33	7	3
2,38	37	8	3	40	9	3	36	7	4	39	8	3
2,55	32	8	4	36	6	3	34	6	6	35	9	3
2,40	33	5	5	37	5	3	36	4	5	39	5	3
2,40	37	6	4	37	7	4	38	6	5	38	6	3
2,83	34	8	5	40	5	3	36	5	4	38	4	2
2,78	34	3	5	36	6	3	34	6	4	36	6	4
2,78	35	6	4	36	5	2	32	5	6	36	5	3
2,65	35	6	5	37	7	2	35	8	4	38	6	3
2,42	34	5	4	37	7	2	38	6	5	38	7	3
2,69	37	6	5	38	3	2	35	6	3	40	8	2
2,46	34	6	4	36	8	2	34	7	4	38	7	2
2,38	34	4	5	36	5	2	34	7	4	35	7	3
2,22	33	4	4	35	6	2	34	6	4	36	5	3
1,88	35	7	5	38	5	3	37	6	4	37	6	3
2,38	36	8	5	41	6	3	38	7	4	37	6	3
2,28	35	6	5	34	5	3	33	4	4	36	5	2
2,40	34	7	4	36	7	3	34	7	4	33	6	3
2,22	34	6	5	36	6	3	35	6	5	35	5	3
2,48	34	5	5	35	5	3	34	4	4	36	6	3
2,83	34	8	5	37	6	3	37	4	4	37	7	2
2,40	38	6	5	40	7	3	33	7	4	39	5	4
2,24	35	4	5	34	5	4	33	7	5	38	4	3
2,58	34	7	5	35	8	4	35	6	4	38	6	3
2,34	33	7	3	36	6	3	38	6	5	39	6	1

CONTINUAÇÃO

2,58	36	4	5	37	6	3	35	6	5	38	5	4
2,48	36	5	6	39	6	3	37	8	4	38	7	3
2,40	35	7	5	40	6	3	37	7	4	36	7	2
2,65	35	7	4	37	5	3	35	8	4	36	6	3
2,56	35	6	5	37	8	3	34	7	3	37	7	4
2,79	36	8	4	38	7	3	36	4	4	37	7	3
2,46	34	6	5	38	6	3	37	5	5	38	6	3
2,60	36	7	3	39	6	3	37	5	4	38	6	2
2,42	34	8	4	35	5	2	33	6	4	37	7	3
2,85	36	6	4	40	6	2	33	5	6	37	5	3
2,50	34	7	3	38	6	3	37	7	5	38	9	3
2,24	37	6	4	38	5	4	36	4	4	38	7	3
2,46	34	7	4	36	9	3	35	8	4	37	8	3
2,69	36	5	6	37	3	3	35	7	4	37	6	3
NINFA III												
1,90	27	4	2	29	4	1	25	4	2	30	4	1
2,11	23	7	2	31	4	1	28	6	2	30	4	1
1,80	23	6	3	29	4	1	28	6	2	27	6	1
1,94	29	5	3	29	5	1	30	6	2	28	6	1
1,86	28	6	2	29	4	1	28	5	2	29	5	1
1,98	28	5	2	29	5	1	27	6	2	31	3	1
1,78	27	5	2	29	5	1	27	7	2	29	5	1
1,92	29	4	2	29	4	1	29	3	2	30	4	1
1,66	29	6	2	29	5	1	31	5	2	27	6	1
2,06	27	5	2	31	6	1	28	5	2	30	5	1
1,88	28	6	2	29	5	1	28	6	2	29	5	1
1,92	28	4	2	30	5	1	28	4	2	29	4	1
2,18	25	6	2	30	4	1	26	5	2	31	4	1
1,84	29	5	2	29	5	1	27	6	2	30	5	1
1,51	28	6	2	27	6	1	27	6	2	29	5	1
2,00	27	6	2	29	6	1	27	5	2	31	4	1
1,84	28	5	2	28	4	1	29	5	2	30	4	1
1,90	28	7	2	28	4	1	29	4	2	28	4	1
1,88	29	5	2	30	4	1	27	7	2	31	4	1
1,88	28	6	2	31	5	1	27	5	2	30	5	1
1,80	29	4	2	31	3	1	26	5	2	30	4	1
2,10	31	6	2	30	6	1	30	3	2	30	6	1
2,06	28	6	2	31	4	1	29	5	2	29	5	1
2,11	28	5	2	31	4	1	28	6	2	29	2	1
1,49	25	5	2	30	5	1	27	5	2	28	4	1
1,93	28	6	2	31	4	1	29	5	1	31	5	1
1,72	27	6	2	29	4	1	26	5	2	28	6	1
1,88	29	6	2	31	6	1	29	6	2	29	4	1
2,14	29	6	2	33	4	1	30	5	2	33	4	1
1,64	29	5	2	30	4	1	27	6	2	31	5	1
NINFA II												
1,49	23	1	1	25	0	0	25	1	1	26	0	0
1,41	23	1	1	26	0	0	24	1	1	24	0	0
1,11	24	1	1	26	0	0	20	1	1	26	0	0
NINFA I												
0,85	18	0	0	20	0	0	19	0	0	19	0	0
0,81	21	0	0	20	0	0	21	0	0	23	0	0
0,93	21	0	0	21	0	0	19	0	0	20	0	0
1,01	18	0	0	19	0	0	19	0	0	20	0	0
1,01	21	0	0	15?	0	0	20	0	0	22	0	0
1,06	20	0	0	21	0	0	21	0	0	21	0	0
0,81	20	0	0	21	0	0	20	0	0	23	0	0
1,11	20	0	0	20	0	0	20	0	0	20	0	0

VARIAÇÃO NO NÚMERO DE DENTES — Como nos pareceu mais importante a variação no número de dentes das quelas, números que damos por extenso na tabela 1, submetemos a testes de significância a variação apresentada pelos dois sexos e pelos diferentes estádios. Os testes empregados foram os mais usuais em estatística: o teste t para comparação de medias, o teste z para comparação de variânças; foi tambem feita a determinação do coeficiente de correlação (r) entre o número de dentes da quela esquerda e o da direita, para avaliarmos o seu gráu de simetria.

TABELA 2

1) Diferença entre os dedos homólogos nos dois sexos, quanto ao número de dentes da fileira normal

Macho × Fêmea		Dedo fixo	Dedo movel
quela direita	n = 65 n' = 27 n'' = 38	$t = 4,2$ $z = 0,39$	$t = 3,5$ $z = 0,22$
quela esquerda	n = 65 n' = 27 n'' = 38	$t = 2,6$ $z = 0,46$	$t = 3,2$ $z = 0,45$

TABELA 3

2) Diferença entre o número de dentes normais dos dedos fixo e movel nos vários estádios

Fixo × Movel		quela direita	quela esquerda
Macho	n = 54 n' = n'' = 27	$t = 4,16$ $z = 0,1$	$t = 3,8$ $z = 0,15$
Fêmea	n = 76 n' = n'' = 38	$t = 5,6$ $z = 0,28$	$t = 5,6$ $z = 0,16$
Ninfa III	n = 58 n' = n'' = 29	$t = 5,1$ $z = 0,37$	$t = 5,1$ $z = 0,06$

TABELA 4

3) Diferença entre o número dos dentes normais dos dedos homólogos das quelas direita e esquerda

Direita × Esquerda		Dedo fixo	Dedo movel
Macho	n = 54 n' = n" = 27	$t = 0,05$ $z = 0,13$	$t = 0,4$ $z = 0,18$
Fêmea	n = 76 n' = n" = 38	$t = 0,5$ $z = 0,07$	$t = 0,2$ $z = 0,04$
Ninfa III	n = 58 n' = n" = 29	$t = 0,47$ $z = 0,23$	$t = 0,6$ $z = 0,03$
Ninfa II	n = 4	$t = 0,16$	$t = 0,9$ . . . . .
Ninfa I	n = 14 n' = n" = 7	$t = 0$ $z = 0,38$	$t = 1,4$ $z = 0,28$

TABELA 5

4) Diferença entre o número de dentes acessórios internos e externos, dos dedos fixo e movel

Fixo × Movel		Fileira interna	Fileira externa
Macho	n = 54 n' = n" = 27	$t = 4,7$ $z = 0,44$	$t = 1$ $z = 0$
Fêmea	n = 76 n' = n" = 38	$t = 10,9$ $z = 0,23$	$t = 0$ $z = 0,07$
Ninfa III	n = 58 n' = n" = 29	$t = 23,5$ $z =$ (1)	$t = 4,1$ $z = 0,03$

TABELA 6

5) Diferença entre o número dos dentes acessórios nas quelas direita e esquerda (2)

Direita × Esquerda		Dedo Fixo		Dedo Movel	
		fil. int.	fil. ext.	fil. int.	fil. ext.
Macho	n = 54 n' = n" = 27	$t = 0,01$ $z = 0,75$	$t = 0,7$ $z = 0,32$	$t = 1,6$ $z = 0,32$	$t = 0,4$ $z = 0,43$
Fêmea	n = 76 n' = n" = 38	$t = 1,1$ $z = 0,02$	$t = 0,5$ $z = 0,06$	$t = 0,23$ $z = 0,06$	$t = 0,7$ $z = 0,12$
Ninfa III	n = 58 n' = n" = 29	$t = 1,5$ $z = 0,5$	$t = 0,8$ $z = 0,17$	$t = 0$ $z = 0$	$t = 0,03$ $z = 0,13$

(1) Sendo nula a variança no número de dentes da fileira interna do dedo movel, para a ninfa III, não é possível compará-la à variança no número do dedo fixo.

(2) A ninfa I não tem dentes acessórios nos dedos da quela; a ninfa II também não os tem no dedo movel, tendo apenas 2 no dedo fixo: um interno e outro externo.

TABELA 7

6) Correlação entre as quelas direita e esquerda no macho e na fêmea, sendo r o coeficiente e t o número que exprime sua significância

Direita × Esquerda	Dedo fixo	Dedo movel
Macho . . . . . n = 27	$r = +0{,}42$ $t = 2{,}3$	$r = +0{,}61$ $t = 3{,}7$
Fêmea . . . . . n = 38	$r = +0{,}08$ $t = 0{,}4$	$r = +0{,}03$ $t = 0{,}17$

Os resultados numéricos obtidos permitem as seguintes conclusões:

1) Há diferença significante no número de dentes da fileira normal dos dedos homólogos, no macho e na fêmea; as variânças são tambem significantemente diferentes.

2) Nos diversos estádios há diferença significante no número de dentes dos dedos fixo e movel, embora suas variânças não sejam significantemente diferentes.

3) Não há diferença significante no número de dentes da fileira normal dos dedos homólogos das quelas direita e esquerda, o mesmo acontecendo com as suas variânças. Porisso podemos considerar o grupo de observações das quelas como duas amostras pertencentes à mesma população, o que simplificou a expressão dos resultados, permitindo reunir os dados da direita aos da esquerda.

4) Há diferença altamente significante no número de dentes da fileira interna do dedo fixo e no da fileira interna do dedo movel, sendo suas variânças tambem diferentes. Não há diferença significante, no macho e na fêmea, quanto ao número de dentes da fileira externa do dedo fixo e no da fileira externa do dedo movel, sendo suas variânças sensivelmente iguais; na ninfa III há diferença significante nos números de dentes das fileiras externas dos dois dedos.

5) Não há diferença significante no número de dentes das fileiras accessórias dos dois dedos da quela esquerda e nos das fileiras e dedos correspondentes da quela direita; suas variânças não são diferentes significantemente, exceção feita ao macho, que na nossa amostra exibe diferença significante.

6) Há pronunciada assimetria individual para o número de dentes dos dedos homólogos das duas quelas, sendo maior a assimetria na fêmea. Apesar da assimetria individual, as médias e as variânças entre os dedos homólogos das duas quelas são sensivelmente iguais, indicando uma simetria de conjunto. Em face das conclusões

acima, é-nos permitido reunir os dados das quelas direita e esquerda no cômputo das médias e dos erros padrões respectivos dos dedos fixo e movel e das varias fileiras de dentes.

TABELA 8

Médias, êrros padrões respectivos e números extremos dos dentes das fileiras normais e acessórias

Estádios	Dedo Fixo			Dedo Movel		
	Fileira normal	Fileira ac. int.	Fileira ac. ext.	Fileira normal	Fileira ac. int.	Fileira ac. ext.
Fêmea N = 78	34,1 ± 0,15 (32 — 38)	4,39 ± 0,08 (3 — 6)	6,02 ± 0,14 (3 — 8)	37,0 ± 0,19 (32 — 41)	2,85 ± 0,06 (1 — 4)	3,19 ± 0,12 (3 — 9)
Macho N = 56	36,3 ± 0,28 (31 — 40)	6,06 ± 0,22 (3 — 9)	5,5 ± 0,13 (3 — 8)	38,5 ± 0,31 (34 — 43)	4,78 ± 0,10 (3 — 7)	5,24 ± 0,14 (3 — 8)
Ninfa III N = 60	27,7 ± 0,20 (23 — 31)	2,0 ± 0,03 (1 — 3)	5,36 ± 0,11 (3 — 7)	29,8 ± 0,17 (27 — 33)	1	4,56 ± 0,11 (2 — 6)
Ninfa II N = 6	23,8 ± 0,26 (23 — 25)	1	1	25,5 ± 0,31 (24 — 26)	0	0
Ninfa I N = 16	19,8 ± 0,25 (18 — 21)	0	0	20,6 ± 0,37 (19 — 23)	0	0

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A análise da variação desta espécie veiu focalizar mais uma vez o problema do "espécime-tipo" das espécies, em sistemática.

Este conceito, suficiente para a época das diagnoses curtas das espécies das faunas e floras locais, decorria da crença numa rigidez dos caracteres específicos, o que não só a experiência atual não tem conseguido confirmar, como está sendo interpretado em termos precisos pelo estudo das populações.

No caso de *Pycnochernes eidmanni* BEIER, cujo tipo é um único exemplar macho, verifica-se que infelizmente faltam a esse exemplar as credenciais para representar, não dizemos a espécie, mas sequer os machos da espécie. De fato, deixando de lado as várias retificações feitas na descrição da espécie, às quais, por economia de espaço, não voltaremos, para só nos preocuparmos com o número de dentes dos dedos das quelas, que constituiram a variavel mais interessante do ponto de vista estatístico, verificamos as seguintes discrepâncias entre o espécime-tipo de BEIER e a amostra da população por nós estudada.

TABELA 9

Macho		Espécime — tipo	Nossa amostra	σ	d	d/σ	d/σ_M
Dedo fixo	Dentes normais	31	36,30 ± 0,28 (31-40)	2,13	5,30	2,48	18,92
	" acc. int.	2	6,06 ± 0,22 (3-9)	1,68	4,06	2,41	18,45
	" " ext.	4	5,50 ± 0,13 (3-8)	1,00	1,50	1,50	11,53
Dedo movel	" normais	31	38,50 ± 0,31 (34-43)	2,35	7,50	3,19	24,19
	" acc. int.	6	4,78 ± 0,10 (3-7)	0,82	1,22	1,48	12,20
	" " ext.	4	5,24 ± 0,14 (3-8)	1,07	1,24	1,15	8,85

Os valores de d/σ indicam que não há diferença significante no número de dentes accessórios externos do dedo fixo e nos dentes accessórios internos e externos do dedo movel entre o espécime-tipo e a amostra estudada por nós, ao passo que o número de dentes normais e accessórios internos do dedo fixo permaneceram no limite da significância; por outro lado, o número de dentes normais do dedo movel escapa apreciavelmente aos valores encontrados na população estudada, o que, provavelmente, deverá correr por conta, seja de um elevadíssimo carater de peculiaridade do espécime-tipo, o que nos parece pouco provavel, seja de uma deficiência técnica no exame dos dentes em questão, cujo estudo exige frequentemente o recurso à dissecção, que nem sempre é bem vista por quem trabalha com um exemplar único, tomado inteiramente ao acaso, e que deverá ser preservado com o mínimo de manipulações a fim de poder assumir, em condições estéticas, a responsabilidade de balisar o conceito da espécie. Outra possibilidade, ainda, a verificar, é a de estar sendo a espécie sujeita a um processo de diferenciação geográfica, o que pretendemos estudar em trabalho seguinte.

Os valores de d/σ_M vieram confirmar as conclusões acima, demonstrando que realmente os números de dentes das quelas do espécime-tipo da espécie afastam-se com alta significância das médias da população por nós estudada, reforçando ainda mais o seu carater de marginalidade.

Assim sendo, pensamos que seria tempo de evitarem os naturalistas, sempre que possivel, o exame sumário de raros exemplares de uma espécie na ânsia de apôr-lhes a etiqueta *sp. n.*, para substituí-lo pelo estudo minucioso, demorado, lento e nem sempre bem compreendido pelos leigos, da sua organização, bionomia e ecologia, baseado não só em técnicas adequadas, como num amplo espírito científico, afim

de que possa resultar da grande massa dos trabalhos que se publicam um progresso real no conhecimento dos seres vivos, tornando desnecessário o recorrer-se permanentemente ao re-estudo do que já havia sido estudado, cada vez que o nivel de exigência em matéria de conhecimentos se torna mais elevado.

EXTERNAL MORPHOLOGY AND ANALYSIS OF THE TAXONOMIC CHARACTERS OF *"PYCNOCHERNES EIDMANNI* BEIER, 1935" *(CHELONETHIDA: CHERNETIDAE)* FROM THE REFUSE CHAMBERS OF THE NESTS OF *"ATTA SEXDENS RUBROPILOSA* FOREL, 1908".

Abstract

A careful description of the external morphology is given; the numerical variation of the teeth of the chelae is statistically analysed, a confront being made with the assigned numbers of the type-specimen. The concept of type-specimens is discussed, and the necessity of a wider study of the species is emphasised.

BIBLIOGRAFIA

BEIER, M. — 1933 — Revision der Chernetidae. *Zool. Jahrb.*, Jena (System.), 64 (6): 522.

BEIER, M. — 1935 — Ein neuer Pseudoscorpion aus Atta-Nestern. *Zool. Anz.*, Leipzig, 111 (1): 45-46, 1 fig.

CHAMBERLIN, J. C. — 1931 — The Arachnid Order Chelonethida. *Stanford Univ. Publ. Biol.*, ser. 7 n.º 1: 1 — 284, 71 figs.

PEREIRA, C. & M. P. de CASTRO — 1943 — Um método de impregnação argêntica para o estudo da morfologia interna de invertebrados microscópicos em toto-montagem. *Arquivos do Inst. Biol.*, S. Paulo, 14 (12): 207-212; Est. 18 e 19.

SIMPSON, G. G. & A. ROE — 1939 — *Quantitative Zoology.* 1.ª ed., XVII e 414 pp. McGraw — Hill Book Company, Inc. New York.

Vol. 15 — Art. 15 Dezembro de 1944

OSTEOFIBROSE DOS EQUÍDEOS NO BRASIL

"CARA INCHADA"

POR

J. Moreira e C. H. Florence

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com as estampas 16-25

INTRODUÇÃO

Entre nós, no terreno da patologia veterinária, as moléstias osteodistróficas dos animais domésticos ocupam um lugar de relevância considerável. E no que se refere aos equídeos, verificamos que a osteofibróse é a mais importante de tôdas elas.

Em meiados de 1939, em conseqüência do número sempre crescente de consultas sôbre o assunto, e de casos dessa doença encontrados, tivemos a idéia de encetar uma série de experiências de tratamento, a-fim-de conseguir dados práticos para a solução do problema.

Existem muitos criadores de cavalos e muares que zelam pelo regime alimentar dêsses animais. Rações criteriosamente feitas, isto é, as rações balanceadas, já são ministradas às criações pelos que compreendem a importância do problema. Contudo, constituem êstes um núcleo ainda pequeno, tendo-se em conta o número de criadores e das criações existentes em nosso Estado. No que diz respeito às fazendas e sítios, de um modo geral, excetuando-se as criações a que acima nos referimos, o sistema alimentar predominante é o da ração concentrada de grãos, ou o regime de pasto com uma pequena ração de grãos, ou, o que é também muito comum, o regime exclusivamente de pastagem. O elevado preço da alfafa, a falta de hábito de administrar as misturas suplementares corretivas e, muitas vezes, o completo desconhecimento da importância do problema, são os motivos da ausência quase generalizada de rações melhoradas.

E' sabido que em muitas fazendas do Estado a molestia aparece anualmente em um número bem elevado de equideos.

Numa das fazendas do nosso interior, por exemplo, com um efetivo de cerca de 800 equinos e muares, de criação e de trabalho, são registrados anualmente cerca de 120 casos de Osteofibrose. Nesta propriedade, o regime alimentar é de pasto para as éguas de cria e de pasto e suplemento de milho para os animais de trabalho. Como o preço da medicação utilisando os produtos mais aconselhados é elevado, e o tempo necessário para a cura completa dos doentes é bastante longo, a direção da fazenda opta pelo sistema de sacrifício em massa

dos doentes e sua substituição por outros animais. Embora no fim de certo tempo as levas de animais vindas das mais diversas zonas, devam tambem, em consequencia da molestia, seguir o mesmo caminho das antecessoras, acham os responsaveis que, em virtude do grande número de doentes, este ainda é o método menos oneroso, menos trabalhoso e, consequentemente, mais compensador.

Sabemos que a maioria das nossas terras é bastante pobre de certos sais minerais, e muito especialmente de sais de cálcio. Sendo a "cara inchada" dos equideos uma molestia que ocorre em consequencia de diferenças porcentuais na relação cálcio-fósforo nos alimentos, facil se torna compreender o elevado número de casos. Não devemos, além disso, esquecer a importância marcante que a água de acidez elevada, ingerida pelos animais, pode ter no desenvolvimento da doença.

Quando a molestia irrompe numa criação, mesmo entre os fazendeiros providos de maiores recursos, nem sempre a solução do problema atinge o limite satisfatorio, pois quanto aos fins economicos a molestia não deve ser combatida com o objetivo exclusivo da cura dos doentes. O combate, como aliás acontece de um modo geral em veterinaria, deve ser orientado e conduzido rigorosamente no sentido direto e principal, que é a profilaxia da doença.

Com referencia à acidez das nossas terras, reproduzimos abaixo uma tabela de analises feitas pelo Instituto Agronômico de Campinas, em terras de diversas regiões do Estado, pois E. RUSSEL é tambem de opinião que a presença e a quantidade dos sais de cálcio influem na acidez dos solos, dependendo naturalmente do poder tampão neles exercido pelo humus, pela argila e pelos fosfatos.

TABELA 1

Análises realisadas no Instituto Agronômico de Campinas em terras de diversas regiões do Estado de São Paulo, mostrando as variações do Ph segundo O. SAES e H. KRULL

	Variação Ph
Atibaia	4,8 — 5,9
Campinas	4,8 — 5,6
Descalvado	4,6
Itapetininga	5,6 — 5,9
Jundiaí	4,4
Limeira	4,6 — 5,9
Lins	5,0 — 5,7
Monte Mór	5,3 — 5,7

	Variação Ph
Santos	3,6 — 4,3
São Carlos	5,7 — 5,8
Sorocaba	5,7 — 5,9
Tietê	4,7 — 6,0

TABELA 2

Acidez (Ph) segundo José Setzer

Ph até 4,5	Muito ácido
4,5 a 5,3	Fraco
5,4 a 6,0	Regular
6,1 a 6,9	Bom
7,0 a 7,5	Muito bom
Acima de 7,5	Ótimo

ETIOLOGIA

Diversas teorias foram aventadas para explicar a etiologia da osteofibróse dos equideos. Não vamos entrar na analise dessas teorias, que são do conhecimento geral e estão assinaladas em todos os tratados clássicos de patologia veterinaria. De um lado surgiu a hipótese de um agente infeccioso de origem bacteriana, de outro a hipotese da ação de infestações parasitarias intensas (Conreur) e ainda a idéia de um disturbio endocrino das paratiroides. Trataremos apenas da teoria do desequilibrio mineral da relação $CaO : P^2O^5$, em que nos estribamos para nossas experiencias, surgida dos trabalhos de Theiler e Green na Africa do Sul inglêsa, teoria já aceita e consagrada pelos melhores autores que trabalharam mais largamente o problema. Fizemos experiências em torno do assunto, porque, como dissemos, desejavamos apresentar uma solução prática para o problema em nosso meio. Era do mesmo modo importante determinar si as causas que condicionam o aparecimento da doença, demonstradas pelos autores que trabalharam na Africa do Sul, eram identicas às daquí, ou si o problema apresentava aspectos etiologicos diversos, isto é, si a doença em nosso meio se superpunha à dos outros paises. E' fato já assentado que a "cara inchada" aparece nos equideos, segundo Theiler e Green, quando há uma predominância excessiva do P^2O^5 sobre o CaO, na alimentação básica. Os animais podem apresentar uma predescalcificação, mesmo quando a relação $CaO : P^2O^5$ já começa a atingir as vizinhanças de 1:2. E a molestia progride, rápida e intensamente, à medida que a proporção do P^2O^5 se fôr acentuando nas rações.

As observações por nós levadas a efeito, nas fazendas onde a molestia aparece espontaneamente, revelaram que a proporção cálcio-

fósforo nos alimentos dados aos animais éra, no mínimo, de 1:9, tomando-se por base as tabelas de Morrisson.

Embora partidarios da teoria do desiquilibrio cálcio-fósforo, decorrente de um regime alimentar defeituoso, na genese da doença em nosso meio, não excluimos aqui a possibilidade do papel que pode ser representado pelos distúrbios das glandulas paratiroides, no aparecimento de um quadro clinico e anatomico identico ao da "cara inchada" dos equideos. Acreditamos mesmo que, sendo essas glandulas de vital importância para o metabolismo do cálcio, delas dependem às vezes muitas das alterações ósseas verificadas. São bem conhecidos os distúrbios tumorais das paratiroides que, por uma hiperfunção, produzem a osteite fibrosa nos animais domésticos. E mesmo experimentalmente, já foi demonstrado que, inoculando-se ratos e cobaias com extratos de paratiroide, diariamente, a osteofibróse pode ser provocada num praso relativamente curto. Não há, pois, dúvidas quanto ao poder regulador do metabolismo do cálcio exercido pelas paratiroides. Em caso de disfunção, dão lugar a perturbações já bem demonstradas.

Mas afora os distúrbios iniciais ocorridos num ou noutro animal, com o subsequente aparecimento da osteofibróse, não acreditamos que entre os nossos equídeos atacados, em grande número, de osteofibróse, as paratiroides tenham qualquer papel inicial e autônomo. Pensamos que é com o decorrer do tempo, e em consequencia de um regime alimentar desiquilibrado quanto ao cálcio e fósforo, que, secundariamente, as paratiroides, por uma questão de distúrbios, entram a desempenhar papel acelerador para o agravamento da doença. O mesmo aliás, podemos lembrar no caso da falta de vitamina D, que como se sabe tem papel importantissimo na fixação do cálcio do sangue circulante, no organismo.

Assim, pensamos que, em criações de equideos cujo regime alimentar seja balanceado, sobretudo no que diz respeito à relação cálcio-fósforo, a "cara inchada" não deve ser verificada, a não ser, como dissemos, por uma alteração primaria das paratiroides, e nestas condições, em casos absolutamente isolados e fóra da nossa discussão.

Quanto à vitamina D, pensamos não ser, em nosso meio, de importância especial, em virtude do clima e da vida ao sól em que são mantidos os animais.

Como causas coadjuvantes no aparecimento ou no desenvolvimento da doença, lembramos a subnutrição, as verminoses e a reclusão em que às vezes são mantidos os animais. A falta de vitamina C, favorecendo uma descalcificação, ou uma alimentação com plantas

com excesso de fluor e oxalatos, podem ser consideradas causas predisponentes.

O argumento que nos parece decisivo no sentido de mostrar que é o disturbio da relação mineral a causa inicial e importante da doença em nosso meio, é dado pelo seguinte fato: basta restabelecer o equilibrio para ver diminuir a freqüência da doença ou o seu desaparecimento da criação atingida, ou para se realizar a cura, como se verifica na seqüência das nossas experiencias.

SINTOMAS

Clinicamente o quadro primario da molestia é o seguinte, dividido esquematicamente em fases:

A principio os doentes mostram apenas maior sensibilidade para as marchas longas e sobretudo forçadas; antes mesmo de quaisquer outros sintomas, apresentam-se como se estivessem atacados de reumatismo na sua forma ainda bastante discreta, ou melhor, inicial. Esta fase, que chamaremos aqui de primeiro grau da doença, passa quasi despercebida. Quando notada, recebe de pronto o rótulo de miosite reumatica ou outros tantos rótulos correspondentes às diversas enfermidades que tornam os animais mais ou menos impossibilitados para os trabalhos pesados.

Num estado mais adiantado, que chamamos de segundo grau da doença, notamos maior ou menor dificuldade locomotora do trem posterior dos animais atacados. A este estado, já perceptivel de todos, porém, ainda confundivel com outras doenças, os criadores referem-se, dizendo, muito logicamente, que: o "animal está atado", em virtude da maneira nitidamente presa ou arrastada pela qual se dá a sua locomoção.

Nos dois estados acima referidos, a molestia já se encontra instalada e em franca progressão, sem que, apesar disso, se possa notar, à primeira vista, outra qualquer manifestação clinica. Ao examinarmos, entretanto, um doente no segundo grau da molestia, podemos notar que ele apresenta extrema sensibilidade da região lombar. Ao se tocar essa região, os doentes encurvam-se de maneira acentuadíssima, em conseqüência da dôr que a compressão provoca. Uma sensibilidade mais ou menos perceptivel póde ser também observada nas costelas ou nas canelas, quando imprimimos uma pressão com o dedo polegar. A reação à dôr provocada é, até certo ponto, bastante característica.

Num estádio a que chamaremos de terceiro grau da doença, em que a molestia já se encontra francamente desenvolvida, podemos notar, mesmo de longe, as suas manifestações esteriorisadas e incon-

fundiveis. Notamos aquí, de maneira mais ou menos nítida, de acôrdo com o grau de intensidade da doença, o aumento caracteristico e bilateral dos ossos dos maxilares superiores e, mais tarde, ainda dos ossos submaxilares. Pela percussão, nota-se o som característico do osso alterado. Desse aumento geral de volume dos ossos da cara do animal adveio, muito acertadamente, da observação popular, a denominação de "cara inchada", pela qual a molestia é conhecida entre nós. Ao lado desse sintoma predominante da doença, os animais apresentam aspecto triste e emagrecido. À medida que o quadro clínico evolue, a preenção e a mastigação dos alimentos vai-se revestindo de crescentes dificuldades. A respiração póde ser às vezes muito dificultada pela obliteração dos sinus nasais, em conseqüência da hipertrofia dos ossos dessa região. No fim da doença os animais apresentam uma acentuada caquexia, inanição, e caem para não mais se levantarem. Não são raros os casos de fraturas dos membros em conseqüência de quedas sofridas. A morte sobrevem com um quadro do mais completo marasmo.

PARTE EXPERIMENTAL

Quando iniciamos os trabalhos acerca da osteofibróse, não conheciamos nenhum método prático para o diagnóstico da doença na sua fase inicial. O processo do "estilete" que se introduz nos ossos frontais não dá, de forma alguma, indicações certas. O Raio X seria o processo ideal, mas seu uso é absolutamente limitado. Ocorreu-nos a idéa de adotar para fim de diagnóstico e para controle dos resultados nos animais em tratamento, o processo da dosagem do cálcio e do fósforo no sangue. Mais tarde foi-nos possivel lançar mão de exames radiológicos para controle da marcha do tratamento dos doentes e, ultimamente, fizemos biópsias de ossos com o auxilio de um trepano muito engenhoso ideado pelo Dr. J. R. MEYER.

Dispuzemos, para experiencias de tratamento, de um lote de 6 muares, em estado mais ou menos idêntico da doença. O proprietario não pôde informar quanto ao inicio da molestia, e havendo em sua fazenda, em Cafelandia, neste Estado, mais de vinte animais atacados, separou o referido lote de seis e o enviou ao Instituto Biológico. O trabalho desses animais consistia em tração de carroças de terra. A alimentação era feita de capim, milho e farelo de trigo. Chegados ao Instituto, foram os animais numerados, separados em báias, e a cada um foi oferecido um regime (rações, A, B, C, D, E, F) adequado à experiência que ia ser realizada com relações diversas de teor cálcio-fósforo.

Todos os animais em experiencia eram examinados diariamente pela manhã, durante todo o periodo do tratamento. Todas as colheitas de sangue para exames de cálcio e fósforo eram feitas durante os periodos de jejum dos muares. Nos dias de sol, eram soltos num piquete durante três horas. Além dos lotes de animais em experiencia, fizemos numerosas analises do sôro sanguineo de animais doentes para conhecer o teôr do fósforo e do cálcio no sangue, e as variações existentes.

Fizemos tambem grande número de analises do sôro de animais normais, para serem conhecidos o teôr de fósforo e de cálcio e as suas variações.

EXPERIÊNCIA N.º 1

MUAR N.º 1

Chegada: 30-8-39

Idade: 4 anos

Diagnóstico: osteofibróse em terceiro grau.

Estado geral: emagrecimento, grande aumento dos ossos maxilares superiores e inferiores. O exame pela percussão denunciava estado anormal dos ossos.

Em 31-8-39 — 1.ª sangria, pela manhã. Foram colhidos 50 cc de sangue para as dosagens de P e Ca no sôro, com o seguinte resultado:

Fósforo	3,47 mg. %
Cálcio	11,14 " "

A partir de 2-9-39, e durante toda a experiência, foi administrado o seguinte regime alimentar diário:

Ração A.

Milho quebrado . . . . 2 quilos	Relação $CaO:P_2O_5$ — 1:3,27 (Tab. Morrison)
Farelinho de trigo . . . 1 quilo	
Farelo de trigo . . . . 1 »	
Alfafa . . . . . ½ »	
Capim angola verde . . 5 quilos	

Ração administrada duas vezes por dia.

Cloreto de sódio, 30 gramas, 3 vêzes por semana.

Como medicação foram juntadas à ração 100 grs. de farinha de osso por dia.

Em 11-10-39, isto é, ao cabo de 40 dias de tratamento, o animal se apresentava com aspecto geral bom, estando gordo e bem vivo. Foi feita a 2.ª sangria nas mesmas condições da primeira, com o seguinte resultado:

Fósforo	4,00 mg. %
Cálcio	18,28 " "

Em 5-3-40 o doente se achava já pràticamente curado, do ponto de vista geral. Estava gordo, com o pêlo brilhante, esperto e sem nenhuma sensibilidade ao toque. O aumento dos ossos dos maxilares superiores e submaxilares apresentava-se ligeiramente diminuido. Foi sangrado, como anteriormente, para exame, com o seguinte resultado:

Fósforo	5,33 mg. %
Cálcio	13,21 " "

Em 3-6-40 o doente foi considerado curado, à vista de seu aspecto sadio. Apresentava resquícios de aumento dos ossos dos maxilares superiores. Os ossos dos submaxilares estavam normais. O exame de percussão revelou osso normal. Foi feita a colheita de sangue para o último exame, com o seguinte resultado:

Fósforo	4,00 mg. %
Cálcio	13,21 " "

O animal foi devolvido ao proprietário em 8-8-40.

EXPERIÊNCIA N.º 2

MUAR N.º 2

Chegada: 30-8-39.

Idade: 3½ anos.

Diagnóstico: osteofibróse em terceiro grau.

Estado geral: muito magro e trópego; ossos dos maxilares muito hipertrofiados. Exame de percussão: osso anormal.

Em 31-8-39 — 1.ª sangria. Foram colhidos 50 cc de sangue para as dosagens de P e Ca, no sôro, com o seguinte resultado:

Fósforo	2,90 mg. %
Cálcio	19,14 " "

Em 2-9-39 iniciou-se o seguinte regime alimentar diário, que durou todo o período da experiência:

Ração B.

Milho quebrado . . . . 2 quilos Farelinho de trigo . . . 1 quilo Farelo de trigo . . . . 1 » Capim angola verde . . 5 quilos	Relação $CaO:P^2O^5$ — 1:5,77 (Tab. Morrison)

Ração administrada duas vezes por dia.

Cloreto de sódio, 30 gramas 3 vêzes por semana.

Como medicação, foram juntadas à ração 40 gramas de cloreto de cálcio por dia.

Em 11-10-39, o animal apresentava aspecto bom, estava esperto e um tanto mais gordo. Foi feita a 2.ª sangria nas mesmas condições da primeira, com o seguinte resultado:

Fósforo	4,76 mg. %
Cálcio	21,35 " "

Em 5-3-39, como no caso anterior, consideramos êste animal curado. Seu aspecto era sadio e êle mantinha-se muito esperto. Nenhuma sensibilidade ao exame pelo toque. Não houve retração completa dos ossos dos maxilares superiores e submaxilares, porém o exame de percussão revelou ossos normais. Foi sangrado para exame, como anteriormente.

Resultado:

Fósforo	4,11 mg. %
Cálcio	13,82 " "

Em 3-6-40 o animal se encontrava em excelentes condições, pois estava gordo, muito bonito e com aspecto sadio. Foi feita a colheita de sangue, como anteriormente, para o último exame.

Resultado:

Fósforo	4,39 mg. %
Cálcio	13,37 " "

Em 1-7-40. Tendo o exame de fezes revelado a presença de Strongylideos, foi administrado um vermifugo, com ótimos resultados.

Em 8-8-40 foi devolvido ao proprietário.

EXPERIÊNCIA N.º 3

MUAR N.º 3

Chegada: 30-8-39.

Idade: 5 anos.

Diagnóstico: osteofribróse terceiro grau.

Estado geral: bastante magro. Ossos dos maxilares superiores e dos submaxilares muito inchados. O exame de percussão revelou osso anormal.

Em 31-8-39 foi feita a colheita de 50 cc de sangue para exame.

Resultado:

Fósforo	2,35 mg. %
Cálcio	10,81 " "

Em 2-9-39 começou a receber o seguinte regime alimentar, o qual durou todo o período da experiência:

Ração C.

Milho quebrado . . . . 2 quilos Farelinho de trigo . . . 1 quilo Farelo de trigo . . . . 1 » Capim angola verde . . 5 quilos	Relação $CaO:P^2O^5$ — 1:5,77 (Tab. Morrison)

Ração administrada duas vezes por dia.

Cloreto de sódio, 30 grs. 3 vêzes por semana.

Como medicação foram juntados à ração 100 cc de óleo de fígado de bacalhau, bruto, por dia.

Em 11-10-39 o doente não apresentava nenhuma melhora. Aspecto triste e feio, porém um pouco mais gordo. Foi feita a colheita de sangue como anteriormente para exame.

Resultado:

Fósforo	4,16 mg. %
Cálcio	15,27 " "

Em 5-3-40 o doente continuava com a moléstia em franca progressão. Pelos exames diários notava-se que o animal, em vez de melhoras, apresentava piores condições em comparação com o estado inicial. Os ossos da cabeça se encontravam mais aumentados; havia grande sensibilidade da coluna na região lombar e das costelas. Andar incerto e arrastado. Exame de percussão: ossos anormais. Foi feita a colheita de 50 cc de sangue para exame.

Resultado:

Fósforo	4,39 mg. %
Cálcio	11,81 " "

Em 15-4-40 verificamos que a magreza, que já vinha sendo notada, agravara-se de maneira alarmante. Todos os demais sintomas, muito acentuados.

Em 20-4-40 o doente começou a cair na báia. Tal era o estado de fraqueza em que se encontrava, que não se podia manter fàcilmente de pé.

Em 23-4-40 verificou-se a morte do animal em completo estado de inanição. Feita a autópsia, nada de anormal, além da anemia, foi notado em nenhum dos órgãos. No esqueleto notou-se todo o quadro de uma completa desmineralização.

EXPERIÊNCIA N.º 4

MUAR N.º 4

Chegada: 30-8-39.

Idade: 11 anos, mais ou menos.

Diagnóstico: osteofibróse no terceiro grau.

Estado geral: magreza acentuada. Pêlos arrepiados. Andar pesado. Ossos dos maxilares superiores e submaxilares extraordinàriamente aumentados de volume. Exame de percussão: osso anormal.

Em 31-8-39 foi feita a colheita de 50 cc de sangue para exame.

Resultado:

Fósforo	3,01 mg. %
Cálcio	10,81 " "

Em 2-9-39 começou a receber o seguinte regime alimentar, que durou todo o período da experiência.

Ração D.

Milho quebrado	2 quilos	Relação $CaO:P^2O^5$ — 1:5,77 (Tab. Morrison)
Farelinho de trigo . . .	1 quilo	
Farelo de trigo	1 »	
Capim angola verde . .	5 quilos	

Ração administrada duas vezes por dia.

Cloreto de sódio, 30 grs. 3 vêzes por semana.

Como medicação foram juntadas à ração 100 grs. de farinha de osso e 60 cc de óleo de fígado de bacalhau, bruto.

Em 11-10-39 apresentava melhor aspecto e estava mais gordo. Foi feita a colheita de sangue para o exame como anteriormente.

Resultado:

Fósforo	3,30 mg. %
Cálcio	14,04 " "

Em 5-3-40 o doente apresentava melhoras no estado geral. Continuava porém com os sintomas clínicos da doença: ossos da cabeça muito aumentados, sensibilidade da região lombar e andar preso. Foi feita a colheita de sangue, como anteriormente, para exame.

Resultado:

Fósforo	4,57 mg. %
Cálcio	11,25 " "

Em 3-6-40 o doente não apresentava modificações notáveis; a moléstia achava-se estacionada. Foi feita a colheita de sangue, como anterorimente, para exame.

Resultado:

Fósforo	3,96 mg. %
Cálcio	11,25 " "

Em virtude do exame de fézes ter revelado a presença de Strongylideos, foi administrado um vermifugo, com sucesso.

Êste caso foi considerado incurável.

EXPERIÊNCIA N.º 5

MUAR N.º 5

Chegada: 30-8-39.

Idade: 5 a 6 anos.

Diagnóstico: osteofibróse terceiro grau.

Estado geral: bastante magro. Ossos dos maxilares superiores grandemente aumentados. Exame de percussão: osso anormal. Ossos dos submaxilares pouco aumentados de volume. Sensibilidade da região lombar acentuada. Sensibilidade pouco pronunciada das costelas.

Em 31-8-39 foi feita a colheita de 50 cc de sangue para exame.

Resultado:

Fósforo	5,00 mg. %
Cálcio	14,49 " "

Em 2-9-39 começou a receber o seguinte regime alimentar, que durou todo o período da experiência:

Ração E.

Milho quebrado	2 quilos	Relação $CaO:P_2O_5$ — 1:9,95 (Tab. Morrison)
Farelinho de trigo . . .	1 quilo	
Farelo de trigo	1 »	
Capim angola verde . .	2 quilos	

Ração administrada duas vezes por dia.

Cloreto de sódio, 30 grs. 3 vêzes por semana. Como tratamento, juntamos no bebedouro 1000 cc de água de cal por dia. Na ração acrescentamos 4 quilos diários de alfafa.

Em 11-10-39 notamos uma fraca melhora do animal. Estado geral bom. Ao exame pelo toque apresentava-se pouco dolorido. Tinha-se a impressão nítida que havia uma grande reação do organismo. Foi feita a colheita de sangue, como anteriormente, para exame.

Resultado:

Fósforo	3,63 mg. %
Cálcio	16,04 " "

Em 5-3-40 notou-se melhora do estado do doente em relação ao que se observara em 11-10-39, embora só se verificasse ligeira diminuição dos ossos dos maxilares superiores. Foi feita a colheita de sangue como anteriormente, para exame.

Resultado:

Fósforo	3,44 mg. %
Cálcio	10,92 " "

Em 20-4-40 notamos que o doente apresentava francas melhoras, com diminuição sensível dos ossos dos maxilares superiores. Ao toque da região lombar, já não se notava nenhuma sensibilidade. Exame de percussão: normal.

Em 3-6-40 o animal foi considerado curado, pois não apresentava nenhum sintoma da doença. Foi feita a colheita de sangue, para exame, como anteriormente.

Resultado:

Fósforo	3,97 mg. %
Cálcio	14,49 " "

Em 1-7-40 êste animal sofreu forte contusão na articulação do membro anterior esquerdo, que resultou em forte manqueira e grande inflamação subseqüente. Em 31-7-40 resolvemos sacrificar êste animal para verificar o processo de reconstrução dos ossos (Estampa 24, figs. *Q* e *R*).

EXPERIÊNCIA N.º 6

MUAR N.º 6

Testemunha da experiência

Chegada: 30-8-39.

Idade: 6 anos mais ou menos.

Diagnóstico: osteofibróse, terceiro grau.

Estado geral: magreza muito acentuada; ossos dos maxilares superiores e dos submaxilares bastante aumentados. Exame de percussão: osso anormal. Sensibilidade grande na região lombar. Andar preso. Aspecto feio.

Em 30-8-39 foi feita a colheita de 50 cc de sangue para exame.

Resultado:

Fósforo	3,26 mg. %
Cálcio	13,33 " "

Em 2-9-39 começou a receber o seguinte regime alimentar, que durou todo o tempo da experiência:

Ração F.

Milho quebrado	2 quilos	Relação $CaO:P^2O^5$ — 1:5,77 (Tab. Morrison)
Farelinho de trigo . . .	1 quilo	
Farelo de trigo	1 »	
Capim angola verde . .	5 quilos	

Ração administrada duas vezes por dia.

Cloreto de sódio, 30 grs., 3 vêzes por semana.

Em 11-10-39 não se notava nada diferente neste doente. Apresentava-se êle com os mesmos sintomas descritos anteriormente.

Podia-se dizer que não estava nem melhor nem pior. Foi feita a colheita de sangue, como anteriormente, para exame.

Resultado:

Fósforo	3,20 mg. %
Cálcio	13,26 " "

Pelos resultados verificou-se que êste doente se comportara como verdadeira testemunha, pois 41 dias depois de iniciada a experiência, o resultado do exame de sangue se mostrou pràticamente o mesmo.

Em 5-3-40 o doente apresentava grande abatimento e um quadro alarmante da moléstia. Todos os sintomas se achavam muito exacerbados. Foi colhido sangue para exame, como anteriormente.

Resultado:

Fósforo	4,39 mg. %
Cálcio	18,39 " "

Em 30-4-40 o doente, que caía com freqüência na báia, apresentou ligeira paralisia na perna esquerda.

Em 15-3-40 fraturou a cabeça do femur em conseqüência de tombo na báia, não podendo mais se levantar. Em conseqüência disso, foi sangrado para exame (50 cc).

Resultado:

Fósforo	3,20 mg. %
Cálcio	11,25 " "

Piorou progressivamente até que, em 8-6-40, morreu em completo marasmo. À autópsia mostrou: miséria fisiológica e descalcificação.

CASO ADICIONAL

CAVALO N.º 12

Chegada: 4-3-40.
Procedência: Capital.
Idade: 2 anos.
Diagnóstico: osteofibróse, terceiro grau.

Estado geral: pouco magro. Cabeça muito aumentada em conseqüência da grande dilatação dos ossos dos maxilares superiores e inferiores. Exame de percussão: osso anormal. Grande sensibilidade da região lombar. Mastigação difícil. Tendo pelo exame de fézes revelado grande quantidade de Strongylideos, foi-lhe administrado um vermifugo com bons resultados.

Em 10-3-40 foi feita a colheita de 50 cc de sangue para exame.

Resultado:

Fósforo	5,97 mg. %
Cálcio	9,69 " "

Foi iniciado o seguinte regime alimentar:

Milho quebrado . . . . 2 quilos Farelinho de trigo . . . 1 quilo Farelo de trigo . . . . 1 » Capim angola verde . . 3 quilos	Relação $CaO:P_2O_5$ — 1:7,96 (Tab. Morrison)

Ração duas vezes por dia.

Cloreto de sódio, 20 gramas, 3 vêzes por semana.

Como medicação foram juntadas à ração diária, 100 gramas de farinha de osso.

Em 9-7-40 foram colhidos 50 cc de sangue para exame.

Resultado:

Fósforo	4,11 mg. %
Cálcio	13,02 " "

Em 10-9-40 o animal apresentava melhoras acentuadas: achava-se gordo, esperto, sem sensibilidade da região lombar. Ossos da cara muito diminuidos de volume. Foi retirado um fragmento de osso do maxilar superior para exame histológico, tendo-se verificado que o doente se achava pràticamente curado (Estampa 25, fig. *T*).

Resumo das experiências realizadas com outro lote de muares procedentes de Lins, neste Estado:

TABELA 3

N.º dos doentes Muares	Chegada	Diagnóstico	Exame de sangue		Regime e tratamento	Resultados
			Fósforo mg %	Cálcio mg %		
25	7-9-40	Osteofibróse em 3.º grau	5,40	10,60	Identico ao muar 1	Curado
26	7-9-40	Osteofibróse em 3.º grau	5,00	13,40	Identico ao muar 5	Curado
27	7-9-40	Osteofibróse em 3.º grau	3,80	12,00	Identico ao muar 3	Morte em 18-8-42
28 (Testemunha)	7-9-40	Osteofibróse em 3.º grau	5,10	10,60	Identico ao muar 6	Morte em 25-8-42

Não foram possíveis outros exames para as dosagens do cálcio e do fósforo no sangue, neste último lote de animais em experiência.

Além dos animais dos dois lotes já referidos, fizemos a colheita de sangue de mais 44 equinos e muares doentes, todos no 2.º e 3.º graus da doença, e obtivemos a seguinte média:

Fósforo	5,07 mg. %
Cálcio	12,22 " "

Para comparação fizemos ainda a colheita de sangue de 65 equinos e muares sem nenhum sintoma aparente da moléstia. Obtivemos a seguinte média:

Fósforo	4,31 mg. %
Cálcio	13,11 " "

Como se vê, existe uma diferença notável entre as médias obtidas nos exames dos sôros sanguíneos dos animais doentes e dos sãos. No que se refere às médias dos animais sadios, verificamos serem elas idênticas às dosagens do primeiro lote em experiência, quando os animais já se encontravam curados.

Assim sendo, consideramos bôa para os equinos e muares no Estado, quando sadios, a seguinte relação no sôro sanguíneo:

Fósforo	4,00 mg. %
Cálcio	13,00 " "

RESUMO E CONCLUSÕES

O conhecimento da taxa de sais minerais nos solos das diversas regiões é assunto de mais alto interêsse em patologia veterinária.

Numerosos fatôres de clima, altitude, condições físicas do solo, regimen de chuvas, vegetação etc., podem produzir variações consideráveis quanto ao teor dêsses elementos.

O problema do teor dos sais minerais no solo deve ser examinado do ponto de vista de sua repercussão na nutrição dos animais domésticos, principalmente nas regiões onde ocorrem doenças de carência mineral relacionadas com deficiências do solo, pois a relação exata dos sais minerais é tão importante, do ponto de vista da nutrição, como as quantidades necessárias de albuminas, hidratos de carbono, etc.

O teor de sais minerais no soro sanguíneo dos animais tem sido estudado com o intuito de conhecer sua relação com as doenças de carência e no propósito de determinar a possível existência de elementos carenciais específicos que provoquem distúrbios da saúde. Na Inglaterra e nos Estados Unidos, assim como na África do Sul Inglêsa, nas Ilhas Filipinas, vários autores estudaram o problema, pesquizando as variações dos diversos constituintes fisiológicos do sangue dos

equinos, tais como o açúcar, os cloretos, a creatinina, o colesterol, o cálcio, o fósforo inorgânico, as proteinas, etc. (KEHAR, MOHAN, SING, GOVIND, RÁO).

Na região do Brasil em que trabalhamos (S. Paulo), no que se refere aos equídeos, a osteofibróse se manifesta com muita freqüência em várias zonas do Estado, sob a forma de casos em série, com as manifestações clínicas típicas que são referidas, levando à desnutrição e ao marasmo, quando uma providência não é tomada.

Os inquéritos em torno do regime alimentar adotado nas criações, principalmente onde mais se verifica a doença, mostram que há sempre na alimentação dos animais, constituida de gramíneas e grãos, um desequilíbrio da relação $CaO:P^2O^5$. E' esta deficiência que explica o aparecimento da doença nas criações de equídeos.

Experiências conduzidas em equídeos doentes de osteofibróse em várias fases de evolução, permitiram a cura por meio de rações que corrigissem a deficiência cálcica.

Na profilaxia sistematizada da doença, o desejável seria a administração de forragens nas quais a relação $CaO:P^2O^5$ fôsse mantida convenientemente em 1:1. Pràticamente, em nosso meio, essa solução torna-se difícil, senão impossível, pois para formular uma ração correta seria indispensável possuir análises completas das nossas forragens, como existem já em outros paizes. A solução profilática pode ser obtida por meio de forragens ricas de cálcio, como a alfafa.

A farinha de osso, o cloreto de cálcio, ou a água de cal podem restabelecer as deficiências das rações pobres de cálcio.

As numerosas análises do teor de cálcio e fósforo no sôro sanguíneo, de 65 animais normais, cavalos e muares, e de 44 doentes em várias fases de evolução de osteofibróse, permitem formular as seguintes conclusões:

1.º — Nos animais normais o teor fósforo-cálcio de .... 4,00:13,00 mg. por cento como média de numerosas dosagens, deve ser considerado bom para equinos e muares. As oscilações entre 3,07:10,14 e 8,88:18,89 mg.% são encontradas em animais normais.

2.º — Não basta considerar a relação fósforo-cálcio, mas é necessário levar em conta o teor mínimo de cada um dêsses elementos, pois nos animais curados o teor se restabelece de 4,00:13,00 mg.%, como na média dos animais normais examinados.

3.º — Nos animais atacados de osteofibróse, numerosas análises, realizadas em vários períodos, indicam que as máximas encontradas são 8,90:14,82, podendo as mínimas cair a 2,89:9,80, sendo as médias de 5,07:12,22 miligramas por cento.

4.º — Considerando as oscilações verificadas nas análises realizadas nos animais doentes, em vários períodos, assim como nos animais normais, pensamos poder concluir que as análises de fósforo e cálcio no sôro não fornecem elementos seguros para o diagnóstico da doença.

Releva porém observar que nos casos curados nas experiências aqui relatadas, o teor de fósforo-cálcio de 4,00 e 13,00 mg.% se restabelece, o que é significativo porque corresponde à média dos normais.

A dosagem dêsses elementos no sôro serve no entanto como método útil de contrôle da marcha de experiências e dos resultados de tratamento.

As experiências já relatadas indicam de maneira marcante a possibilidade de se obterem rações com uma relação certa de cálcio e fósforo.

Nos animais ns. 1, 2, 4, 5, 12, 25 e 26, aumentamos propositadamente de muito a taxa de cálcio nas rações. Tratava-se de animais com a moléstia em franca evolução, e portanto inteiramente descalcificados. Tinhamos portanto que considerar a cura dêles, e daí a necessidade de ser ministrada uma dose medicamentosa de cálcio, para a reconstrução do sistema ósseo alterado.

Os muares ns. 3 e 27, com a moléstia em andamento e recebendo rações com a relação cálcio-fósforo — 1:5,77, tinham fatalmente que sucumbir, pois sabemos, desde o trabalhos de THEILLER e GREEN, que com uma relação $CaO:P_2O_5$ — 1:5, nos alimentos, a moléstia progride ràpidamente.

O muar n.º 4, embora recebesse um suplemento suficiente de cálcio, ficou com a moléstia apenas estabilizada. Tratando-se porém, de um animal de idade superior a 10 anos, não é demais pensar que alguma alteração endócrina viesse perturbar a marcha do tratamento, impedindo a necessária fixação do cálcio no organismo. E' necessário lembrar que para êsse doente houve a adição de óleo de fígado de bacalhau, bruto, às rações, o que em nada modificou o processo de fixação do cálcio administrado.

Os muares ns. 6 e 28, como testemunha que foram das experiências, nada deixaram a desejar. Sucumbiram com o quadro da moléstia mais típico de quantos já temos presenciado.

TABELA 4

Relação dos exames para dosagens do cálcio e fósforo no sangue dos animais sãos

N.º	Animal	Fósforo	Cálcio
1	Muar	3,80 mg. %	13,37 mg. %
2	»	4,21 » »	12,71 » »
3	»	4,57 » »	13,15 » »
4	»	4,70 » »	14,26 » »
5	»	3,57 » »	14,04 » »
6	»	3,26 » »	13,26 » »
7	»	3,63 » »	16,05 » »
8	»	4,70 » »	17,38 » »
9	»	5,33 » »	15,71 » »
10	»	4,21 » »	13,70 » »
11	»	2,85 » »	15,90 » »
12	»	4,21 » »	12,93 » »
13	»	4,84 » »	16,60 » »
14	»	4,00 » »	12,27 » »
15	»	3,96 » »	13,82 » »
16	»	3,77 » »	15,71 » »
17	»	4,39 » »	14,04 » »
18	»	4,32 » »	12,93 » »
19	»	3,80 » »	13,37 » »
20	»	3,77 » »	13,15 » »
21	»	5,33 » »	11,81 » »
22	»	4,77 » »	12,70 » »
23	Equino	5,00 » »	10,89 » »
24	»	3,80 » »	12,70 » »
25	»	4,00 » »	13,70 » »
27	»	3,80 » »	14,04 » »
28	»	3,20 » »	14,26 » »
37	»	3,48 » »	10,81 » »
38	»	4,21 » »	12,15 » »
39	»	3,72 » »	11,92 » »
40	»	5,92 » »	11,14 » »
41	»	4,70 » »	10,14 » »
42	»	4,44 » »	10,81 » »
43	»	3,48 » »	11,92 » »
44	»	4,48 » »	10,83 » »
45	»	4,57 » »	10,70 » »
46	»	4,32 » »	11,53 » »
47	»	4,44 » »	11,03 » »
48	»	3,33 » »	12,37 » »
49	»	5,26 » »	14,82 » »
50	»	4,32 » »	13,04 » »
51	»	8,88 » »	10,91 » »
52	»	4,57 » »	12,81 » »
53	»	4,00 » »	12,48 » »

TABELA 4 (continuação)

N.º	Animal	Fósforo	Cálcio
54	Equino	5,00 mg. %	12,82 mg. %
55	Muar	4,00 » »	12,15 » »
56	»	4,32 » »	13,48 » »
57	Jumento	3,70 » »	13,29 » »
58	»	4,40 » »	13,63 » »
59	Jumenta	3,90 » »	15,85 » »
61	Equino	3,07 » »	13,27 » »
62	»	3,88 » »	12,12 » »
63	»	3,80 » »	12,00 » »
64	»	4,96 » »	12,47 » »
65	»	3,40 » »	12,94 » »
66	»	4,84 » »	12,12 » »
67	»	4,08 » »	11,65 » »
68	»	3,79 » »	11,77 » »
69	»	5,31 » »	12,24 » »
70	»	4,27 » »	13,17 » »
72	»	3,20 » »	11,17 » »
73	»	4,32 » »	13,40 » »
75	»	6,40 » »	18,89 » »
76	»	5,20 » »	11,42 » »
77	»	6,60 » »	12,47 » »

	Mg. %	
	Fósforo	Cálcio
Máxima	8,88	18,89
Mínima	2,85	10,14
Média	4,31	13,11

TABELA 5

Resultados dos exames feitos nos sôros dos animais doentes

N.º	Animal	Fósforo	Cálcio	Observações
9	Muar	2,89 mg. %	15,16 mg. %	Osteofibróse 3.º grau
10	»	4,10 » »	10,23 » »	» 2.º »
11	Égua	3,96 » »	11,92 » »	» 3.º »
13	Muar	5,33 » »	12,70 » »	» » »
14	»	5,71 » »	14,82 » »	» » »
15	»	3,73 » »	10,03 » »	» » »
16	»	3,90 » »	10,91 » »	» » »
17	Cavalo	5,22 » »	12,70 » »	» » »
18	Muar	5,40 » »	11,37 » »	» » »
19	»	6,34 » »	9,80 » »	» » »
20	»	6,15 » »	12,03 » »	» » »

TABELA 5 (continuação)

N.º	Animal	Fósforo	Cálcio	Observações
21	Muar	4,21 mg. %	12,26 mg. %	Osteofibróse 3.º grau
22	»	4,32 » »	13,82 » »	» » »
23	»	5,55 » »	12,15 » »	» » »
24	»	5,00 » »	12,48 » »	» » »
25 +	»	5,40 » »	10,60 » »	» » »
26 +	»	5,00 » »	13,40 » »	» » »
27 +	»	3,80 » »	12,00 » »	» » »
28 +	»	5,10 » »	10,60 » »	» » »
29	Jumento	5,71 » »	12,00 » »	» » »
31	Cavalo	6,95 » »	12,59 » »	» » »
32	Muar	4,25 » »	12,12 » »	» » »
33	»	5,71 » »	12,47 » »	» » »
34	Equino	4,51 » »	11,89 » »	» » »
35	»	5,19 » »	11,54 » »	» » »
36	»	5,44 » »	10,49 » »	» » »
37	»	8,00 » »	11,07 » »	» » »
38	»	4,00 » »	9,91 » »	» » »
39	»	3,38 » »	11,07 » »	» » »
40	Muar	3,57 » »	11,98 » »	» » »
41	Equino	3,55 » »	11,89 » »	» » »
42	»	4,65 » »	13,17 » »	» » »
43	»	3,74 » »	11,54 » »	» » »
44	»	6,15 » »	13,87 » »	» » »
45	»	5,71 » »	13,29 » »	» » »
46	»	5,71 » »	13,05 » »	» 2.º »
47	»	3,55 » »	12,94 » »	» » »
48	»	3,56 » »	12,24 » »	» » »
50	»	8,00 » »	11,65 » »	» 3.º »
51	»	8,90 » »	12,12 » »	» » »
52	»	7,27 » »	12,47 » »	» » »
53	»	5,71 » »	11,00 » »	» 2.º »
54	Jumento	3,20 » »	11,99 » »	» » »
55	»	3,60 » »	11,22 » »	» » »
56	Muar	5,33 » »	11,77 » »	» 3.º »
57	»	5,51 » »	11,22 » »	» » »
58	»	6,95 » »	10,79 » »	» » »
59	»	4,84 » »	11,33 » »	» 2.º »

	Mg. %	
	Fósforo	Cálcio
Máxima	8,90	15,16
Mínima	2,89	9,80
Média	5,07	12,22

AGRADECIMENTOS

Deixamos aqui consignados os nossos agradecimentos a todos os distintos colegas dêste Departamento, que de várias formas prestaram valiosa colaboração a êste trabalho.

Agradecemos também ao prezado Dr. J. Fajardo, do Departamento da Produção Animal, pelas radiografias aqui incluidas.

OSTEOFIBROSIS IN EQUINES IN BRAZIL, "CARA INCHADA"

Abstract

The increasing number of cases of osteofibrosis in equines, in the State of São Paulo, Brazil, led the authors to perform a certain number of experiments in order to establish a method of controling the disease.

With reference to the equines, the osteofibrosis manifest itself very frequently in different zones of this State, in series of cases with typical clinical manifestations that, if not treated, lead to a breakdown and death.

The inquiries in the farms where the disease is prevalent always evidenced unbalanced $CaO:P^2O^5$ ratio in the animals diet when composed principally of grains and grasses. It is this unbalance which explains the appearance of the disease in the breeding farms.

The P^2O^5 and CaO contents of the bloodplasma of healthy and sick animals has been studied in order that their relation to the wasting diseases might be known.

Equines affected by osteofibrosis in different phases of evolution recovered by administration of balanced rations. In the systematic prophylaxis of the disease, it is also important to administer forrages in which the $CaO:P_2O_5$ ratio is conveniently maintained.

In our country a solution in this direction could be obtained by the use of forrage plants rich in lime, such as alfalfa. Bone meal, calcium chlorid, or lime water, supplemented defficient rations.

The numerous analysis of the percentage of lime and phosphorus in the bloodplasma of 65 healthy equines and 44 sick ones, in the various phases of evolution of osteofibrosis, allowed us to draw the following conclusions:

1) — In healthy animals the $P^2O^5:CaO$ ratio 4.00:13.00 mg percent, as the average, should be considered as good for horses and mules. The oscillations between 3.07:10.14 and 8.88:18.89 mg percent were found in healthy animals.

2) — Beside the $P_2O_5:CaO$ ratio, it is perhaps necessary to consider the minimum amount of each element. In recovered animals

the average of P^2O^5 and CaO reached that found in the healthy animals.

3) — Affected animals presented a wide variation in the P_2O_5:CaO contents (maximum: 8.90:14.82; minimum: 2.89:9.80; average: 5.07:12.22 mg percent).

4) — Owing to the oscillations verified in the bloodplasma of animals in various periods of the sickness, we can conclude that the analysis of the P^2O^5:CaO in the bloodplasma do not afford reliable elements for the diagnostic of the disease.

It should be observed, however, that in the cases subject to experiments, that recovered, the amounts of 4.00% of P^2O^5 and 13.00% of CaO, are reestablished; this being significant because it corresponds to the average found in healthy animals.

The amount of these elements in the serum is, however, useful in the control of the results of the treatment.

BIBLIOGRAFIA

Blunn, C. I., C. E. Horwell and R. W. Caldwell — 1940 — The calcium, inorganic phosphorus, and magnesium content of the blood serum of young horses. *The Journal of Nutrition*, 20: 1-6.

Bolliger, R. — 1934 — Análises sumárias de terra. (Separata da *Revista de Agricultura) Boletim Técnico n.º 12* do Instituto Agronômico do Estado de S. Paulo, em Campinas, p. 3-9.

Bruno da Silva, B. — 1943 — Aproveitamento racional das forragens na alimentação dos equideos. *Diretoria da Intendência do Exército.* Estabelecimento de Subsistência Militar de São Paulo, p. 1-142.

Camargo, Th. de e P. C. de Mello — 1943 — O papel do cálcio na conservação do poder absorvente do solo. (Separata da *Revista de Agricultura) Boletim Técnico n.º 13* do Instituto Agronômico do Estado de S. Paulo, em Campinas, p. 3-12.

Camargo, Th. de e P. Vageler — 1938 — Os solos do Estado de São Paulo. I — Problemas gerais da ciência das solos tropicais e sub-tropicais. *Boletim Técnico n.º 40* do Instituto Agronômico do Estado de S. Paulo, em Campinas, p. 3-35.

Camargo, Th. de e P. Vageler — 1938 — Os solos no Estado de São Paulo. II — O solo na sua concepção moderna. *Boletim Técnico n.º 49* do Instituto Agronômico do Estado de S. Paulo, em Campinas, p. 3-30.

Carini, A. — 1911 — Cara inchada (Osteomalacia ou osteoporose dos cavalos) *Revista Veterinária de Zootecnia*, Rio de Janeiro, 1 (2): 113-121.

Groenewald, J. W. — 1937 — Osteofibrosis in Equines. *Onderstepoort Journ. Veterin. Science Animal Ind.*, Pretoria, South Africa, 9: 601-611.

Henry, K. M. and S. K. Kon — 1939 — Studies on the metabolism of calcium and phosphorus and on the availability of these elements from milk and from an inorganic source. *Biochemical Journal*, 33: 173-191.

HOLZAPFEL, C. R. — 1934 — Modifications of the methods used at Onderstepoort for the determination of (A) Magnesium and Calcium; (B) Potassium, in grass-extracts. *Onderstepoort Journ. Veterin. Science Animal Ind.*, Pretoria, South Africa, 2: 115-122.

HUTYRA, F., J. MARECK, R. MANNINGER — 1938 — *Special Pathology and Therapeutics of the diseases of domestic animals.* Editor: Bailliére, Tindall and Cox. London, 3: 185-235.

JOERST, E — 1929 — *Spezielle pathologische Anatomie der Haustiere.* Editor: Richard Schoetz, Berlin, 5: 795-817.

KEHAR, N. D., M. SINGH, G. RAO — 1940 — Observations on the physiological constituents of equine blood. *Indian Journ. Vet. Science and Anim. Husb.*, 10: 88-93.

KELLNER, O. — 1922 — Principios fundamentais da alimentação do gado. Trad. de Ruy F. Mayer. Editor: A. M. Teixeira e C. Ltda., Lisboa, 507 pp.

KELSER, R. A. and G. R. CALLENDER — 1938 — Equine Degenerative Arthritis. *Vet. Med.*, 33: 307-320.

KINTNER, J. H. — 1940 — The calcium-Phosphorus ratio in the ration of horses. *Vet. Med.*, 35: 640-648.

LINTON, R. G. — 1927 — *Animal nutrition and veterinary dietetics.* Editor: W. Green and Son Ltd., Edinburgh, XII e 393 pp.

MCGOWAN, J. P., and A. R. GORDON EMSLIE — 1934 — Rickets in chickens, with special reference to its nature and pathogenesis. *Biochemical Journ*, 28: 1503-1510.

MAIGNON, F. — 1931 — Les maladies par carence. *Recueil Med. Vet.*, 107: 608-704.

MAUGÉ, P. — 1911 — Contribuição ao estudo da "Cara inchada". *Revista de Veterinaria e Zootecnia*, Rio de Janeiro, 2 (1): 33-35.

MAYNARD, L. A. — 1937 — *Animal Nutrition.* Editor: McGran Hill Book Co., XIV e 483 pp.

MORRISON, F. B. — 1936 — *Feeds and Feeding.* Editor: The Morrison Publishing Co., VI e 1050 pp.

NICOLAYSEN, R. — 1937 — A note on the calcium and phosphorus requirement of rachitic rats. *Biochemical Journal*, 31: 105-106.

NICOLAYSEN, R. — 1937 — Studies upon the mode of action of vitamin D. II — The influence of vitamin D on the foccal output of endogenous calcium and phosphorus in the rat. *Biochemical Journal*, 31: 107-121.

NICOLAYSEN, R. — 1937 — Studies upon the mode of action of vitamin D. III — The influence of vitamin D on the asorption of calcium and phosphorus in the rat. *Bioch. Journal*, 31: 122-129.

NIEBERLE, K. und P. COHRS — 1931 — *Lehrbuch der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere.* Editor: Gustav Fischer,Iena, p. 633-638.

OTTO, J. S. — 1932 — Phosphorus, calcium and protein. *18th. Ann. Rep. Director Veterin. Serv. Union of South Africa.* Onderstepoort, Pretoria, 2: 703-732.

OTTO, J. S. — 1938 — The assimilation of calcium and phosphorus by the growing bovine. *Onderstepoort Journ. Veterin. Science Animal Ind.*, Pretoria, 10: 281-341.

PATWARDHAN, V. N., and N. G. NHAVI — 1939 — The absorption of phosphates from intestine. *Biochemical Journal*, 33: 663-670.

Pires, W. — 1927 — Contribuição ao estudo da anatomia pathologica de osteomalacia. *Revista de Zootecnia e Veterinaria*, Rio de Janeiro, 3: 131-136.

Rubino, M. C. — 1928 — Contribución al estudio de la Osteomalacia em los Bovinos. *Rev. Med. Vet.*, Montevideo, 31: 1-17.

Rubino, M. C. — 1934 — Influencia de la composición del suelo y de los pastos sobre el desarollo de la Osteomalacia de los bovinos. (Hipofosforosis) *Revista Argentina de Agronomia*, 1: 267-292.

Russel, E. J. — 1936 — *Boden und Pflanze.* Editor: Theodor Steinkopf, Leipzig, p. 142-143.

Saes, O. e H. Krull — 1930 — Análises de Terras. *Boletim n.º 2* do Instituto Agronômico do Estado de S. Paulo, em Campinas, p. 5-14.

Schmidt, H. — 1940 — Calcium and Phosphorus deficiences in cattle and horses: clinical picture, treatment and prevention. *Journ. of the American Vet. Med. Assoc.*, 96: 441-458.

Setzer, J. — 1940 — Os solos do Estado de São Paulo. Generalidades sôbre a riqueza química. *Boletim técnico n.º 70* do Instituto Agronômico do Estado de S. Paulo, em Campinas, p. 7-37.

Shelling, D. H. and D. Remsen — 1935 — Renal Ricketz. Report of a case showing four enlarged parathyroides and evidence of parathyroid hypersecretion. *Bulletin Johns Hopkins Hospital*, 57: 158-181.

Stearns, G. and P. C. Jeans — 1934-35 — Utilization of Calcium saltz by children. *Procedings of the Soc. Expe. Biol. and Med.*, 32: 428-430.

Theiller, A. et H. H. Green — 1934 — Les dystrophies osseures des animaux domestiques. *Bull. del'Office International des Epizooties*, 8: 19-117.

Theiller, A., P. J. Du Toit and A. J. Malan — 1937 — Calcium and Phosphorus in the nutrition of Growing Rigs. *Onderstepoort Journ. Veterin. Science Animal Ind.*, 9: 127-164.

Toit, P. J. Du and J. H. R. Bisschop — 1929 — The Breeding of cattle on phosphorus deficient veld. *15th Ann. Rep. Diretor Veterin. Serv. Union of South Africa.* Onderstepoort, Pretoria, 2: 1059-1166.

Toit, P. J. Du, A. J. Malan, J. G. Lonw, C. R. Holzapfel and G. C. S. Roets — 1932 — A study of the mineral content and feeding value of natural pastures in the Union of South Africa (First Report) *18th Ann. Rep. Director Veterin. Serv. and Ani. Industry of South Africa.* Onderstepoort, Pretoria, p. 525-577.

Toit, P. J. Du, A. J. Malan — 1937 — Phosphorus and Calcium deficiency diseases as two oetiologically distinct entities. *Nature*, 140: 153-154.

Wilwerth, A. M. — 1943 — Nota prévia sôbre o teor de fósforo e cálcio no sangue de equinos de Minas Gerais. *Arch. da Escola Superior de Veterinaria do Estado de Minas Gerais.* 1: 27-29.

Wood, T. B. — 1937 — *Animal Nutrition.* Editor: University Tutorial, Londres, VIII e 226 pp.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Estampa 16

Fig. *A* — Cavalo 12. Caso clássico de osteofibrose. Fot. tomada antes do tratamento.

Fig. *B* — O mesmo animal depois de curado.

Estampa 17

Fig. *C* — Muar 25. Caso clássico de osteofibrose.

Fig. *D* — O mesmo animal depois de curado.

Estampa 18

Fig. *E* — Muar 28 com osteofibrose. Testemunha do 2.º lote de experiências.

Fig. *F* — Muar 28. Fot. tomada dois meses antes da morte. Notar o completo marasmo em que se encontra o doente.

Estampa 19

Figs. *G* e *H* — Cavalo 12. Radiografias tomadas na ultima etapa do tratamento. Caso em vias de completo restabelecimento.

Estampa 20

Figs. *I* e *J* — Muar 25. Radiografias tomadas no fim do tratamento. Caso curado.

Estampa 21

Figs. *K* e *L* — Muar 28. Testemunha. As radiografias tomadas na ultima fase das experiências mostram as modificações estruturais ósseas produzidas pela moléstia.

Estampa 22

Figs. *M* e *N* — Muar 6. Testemunha. Crânio com as lesões macroscópicas da moléstia.

Estampa 23

Figs. *O* e *P* — Muar 28. Testemunha. Crânio com as lesões macroscópicas da moléstia.

Estampa 24

Figs. *Q* e *R* — Muar 5. Crânio mostrando a regressão das lesões no animal depois de curado.

Estampa 25

Fig. *S* — Aspeto microscópico da parte esponjosa no maxilar superior de um equino com osteofibrose, não tratado, vendo-se trabeculas em vias de absorção e desaparecimento e forte reação conjuntiva nos espaços medulares. Gentileza do Dr. P. Bueno.

Fig. *T* — Aspeto microscópico da parte esponjosa do maxilar superior do equino da experiência n.º 6, com osteofibrose. Notar o aspéto normal das trabeculas ósseas e o tecido fibroso frouxo nos espaços medulares. Tratado pelo processo indicado na experiência n.º 6.

B

A

D

C

E

F

G

H

I

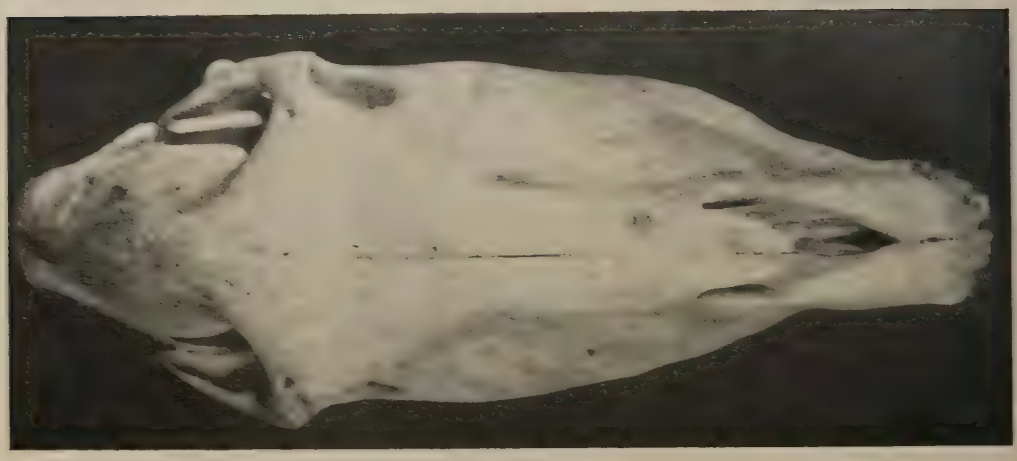
J

K

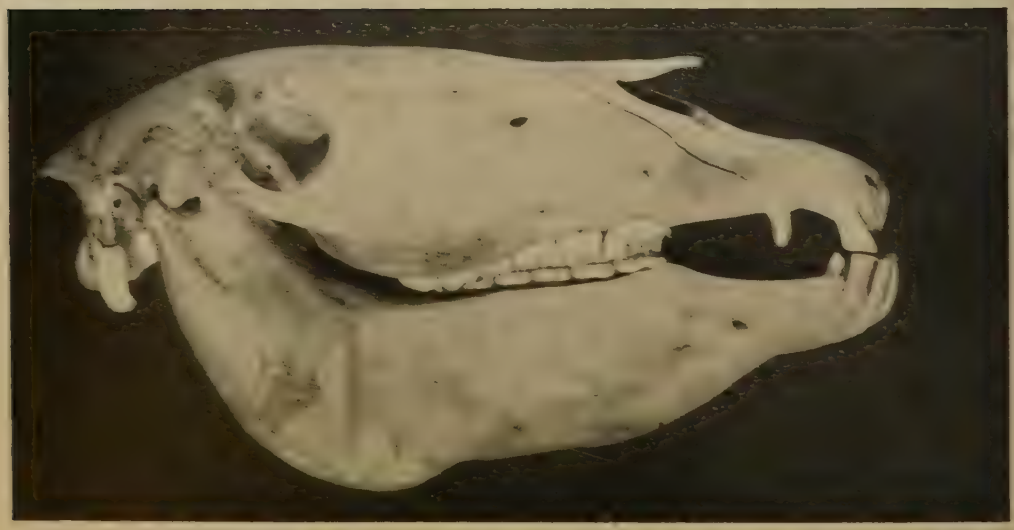
L

M

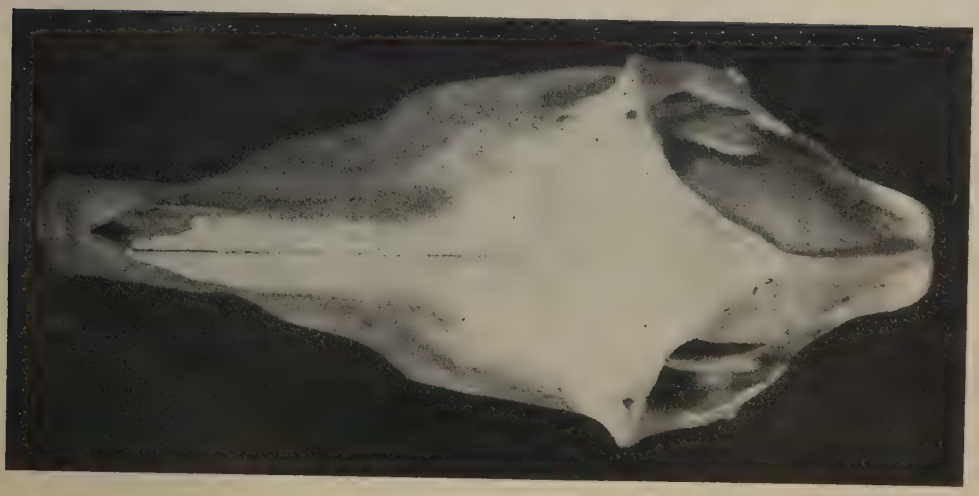
N



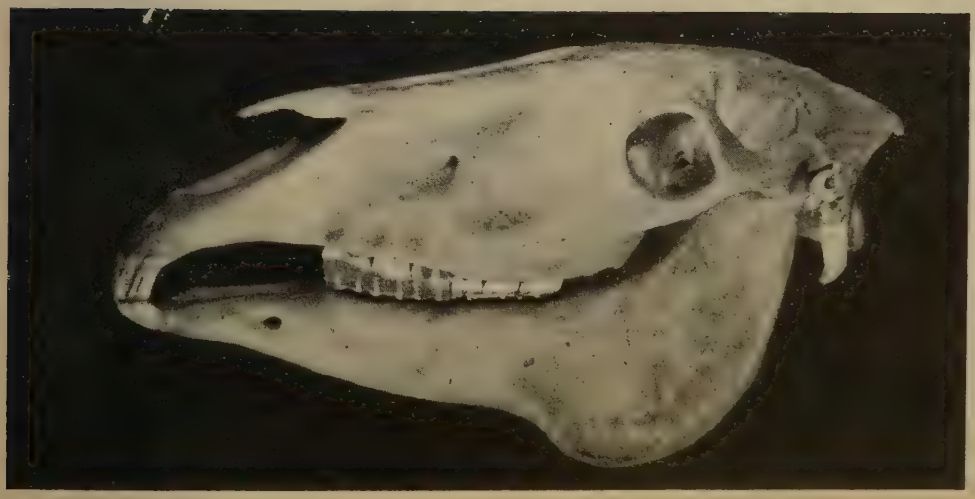
O



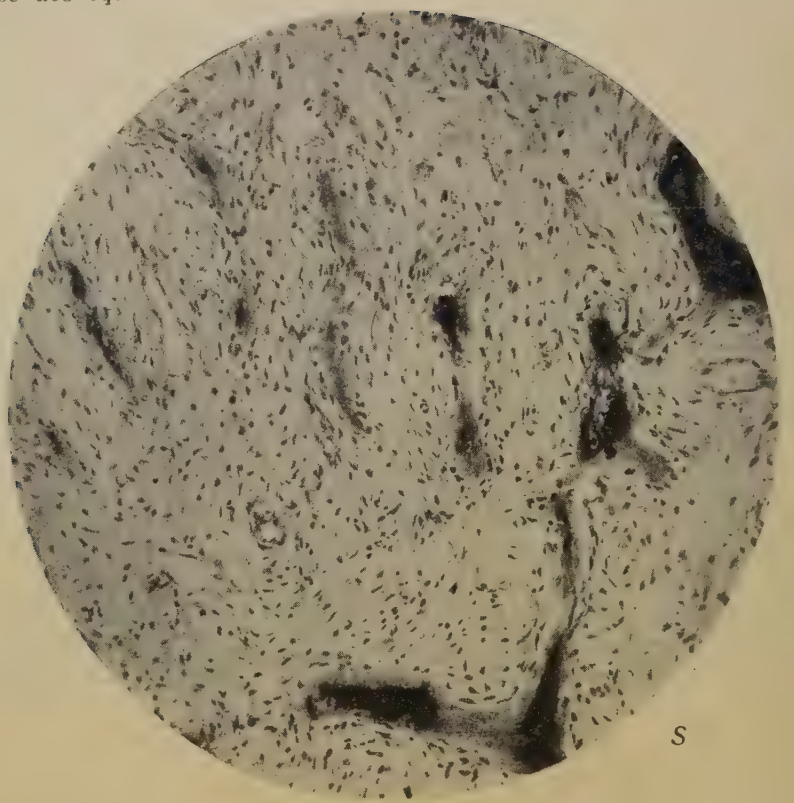
P



Q



R



S

T

Vol. 15 — Art. 16 Dezembro de 1944

NOTAS SÔBRE "XANTHOPASTIS TIMAIS" (CRAM.) (LEP. NOCT.), PRAGA DAS AMARILIDÁCEAS

POR

E. R. de Figueiredo Jr. e Hyder F. Pereira

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com 15 figuras no texto

Há muito tempo vimos observando estragos ocasionados por lagartas em plantas do gênero *Amaryllis*, em chácaras de Santos e São Vicente, tendo sido grande o número de queixas e consultas acerca do daninho inseto. Em nenhuma outra oportunidade, porém, apareceram tão grandes infestações como em junho de 1943.

São responsáveis pelos danos causados a essas plantas as lagartas do lepidóptero *Xanthopastis timais* (CRAM., 1782), pertencente à família *Noctuidae*. Raramente poderão ser encontradas lagartas cuja voracidade se aproxime à destas, posto que nenhuma parte vegetativa da planta está isenta de seu ataque. Êste é iniciado nas fôlhas; quando estas não mais existem, mesmo os bulbos são devorados. até que desapareça qualquer remanescente da planta.

Para que se possa avaliar até que ponto se torna prejudicial a praga, é bastante citar o seguinte fato: um de nossos amigos, residente em Santos, possuia em seu jardim um canteiro em que cultivava *Amaryllis*. Tendo-se ausentado da cidade por cerca de dois meses, ficou devéras surpreso quando, em seu regresso, verificou que de suas plantas não existiam senão algumas partes de fôlhas velhas e pedaços de bulbos inteiramente devastados. Resolvendo revolver a terra do canteiro, aí encontrou, enterradas, centenas de crisálidas do voraz lepidóptero aguardando a metamorfóse final.

DESCRIÇÃO — BIOLOGIA DO INSETO

O v i p o s i ç ã o — As fêmeas, após o acasalamento, depositam os ovos geralmente na face inferior das fôlhas, em grupos de número variável, desde o máximo de 232 ao mínimo de 17.

As posturas foram iniciadas cerca de dois dias após o acasalamento dos indivíduos adultos, sem nenhuma espécie de proteção.

O ovo tem de largura, em seu maior diâmetro, 0,8 mm e de altura 0,6 mm (eixo micropilar). E' achatado, com o tegumento esculpido, observando-se como que gomos verticais, partindo da micrópila, que está situada em uma área deprimida (fig. 1). Córion fragil

transparente. Seu colorido é amarelo pálido logo após a postura; essa côr vai escurecendo com o correr dos dias, passando pelo amarelo ouro até o cinza pardecento, com uma zona circular negra em torno da micrópila, sinal de proxima eclosão. O período de incubação é de 5 dias.

Estádios da lagarta — Foram observados seis estádios para as lagartas da *Xanthopastis timais* (CRAM.), tendo sido realizadas cinco ecdíses durante a sua fase evolutiva, conforme veremos a seguir:

1.º instar — A lagartinha mede 2,2 mm logo após a eclosão, saindo por uma abertura feita com as mandíbulas, lateralmente, logo abaixo da micrópila. O pedaço do córion roido para a saída, é ingerido pela lagartinha, que continua a devorar o restante depois de haver saído. Nesta primeira fase, o seu colorido é amarelo-crême uniforme; cabeça mais larga do que o corpo, de côr pardo-castanha, brilhante; primeiro segmento do tórax manchado dorsalmente de castanho; pernas torácicas escuras; falsas-patas da côr do corpo; pêlos de côr escura, distribuidos por todo o corpo. Depois de haver devorado o córion do ovo que deixaram, as lagartinhas passam a alimentar-se ativamente do parênquima da fôlha, ficando esta reduzida a uma simples pelicula. Seus habitos são gregários. Devido à sua nova alimentação, começam a adquirir tonalidade mais escura. Ao quarto dia de existência, nota-se que deixam de se alimentar, permanecendo sempre em grupos e com a cabeça erguida, sinal evidente de que se preparam para a primeira ecdíse.

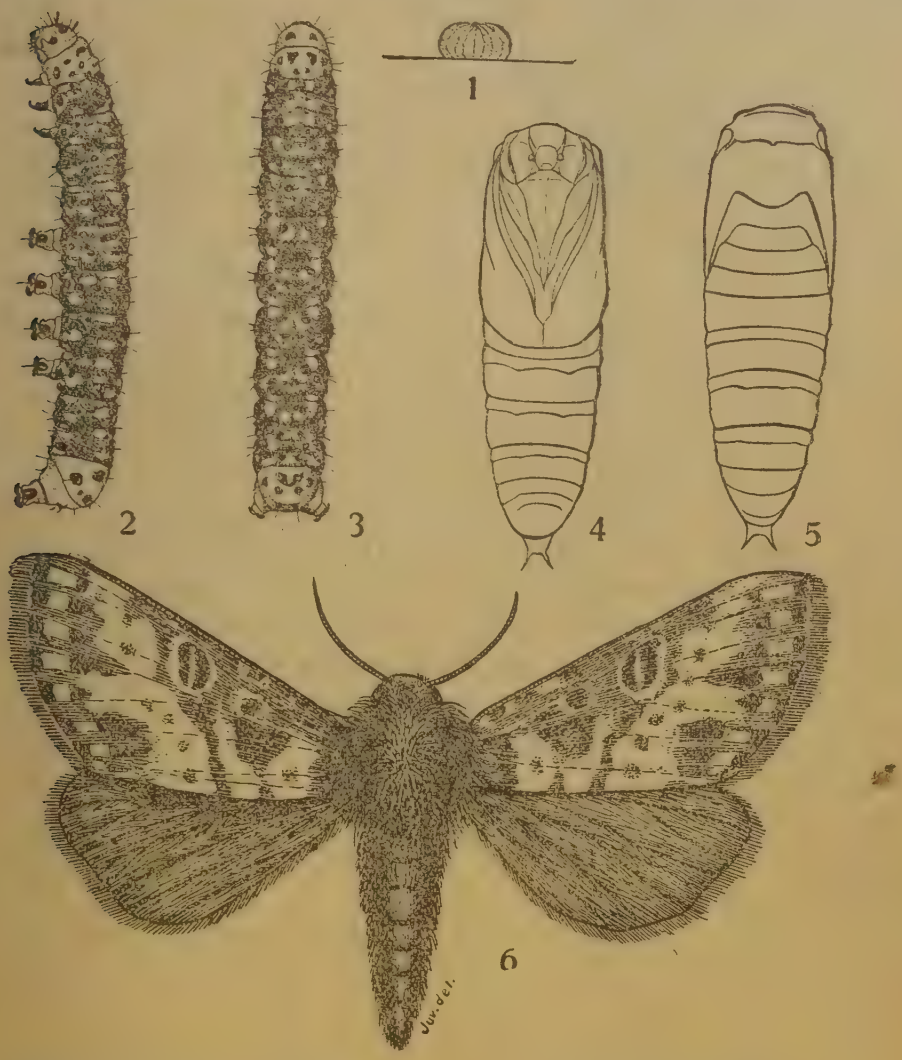
2.º instar — Processa-se ao quinto dia de vida a primeira ecdíse. Colorido geral de fundo esverdeado, verificando-se, ao longo de todo o corpo, listas de côr parda; o primeiro segmento torácico ainda apresenta, dorsalmente, a mancha da primeira fase, agora pardo-negra, transformada em verdadeira placa quitinosa, a qual também se observa, ainda dorsalmente, no segmento anal. Cada segmento abdominal apresenta doze longos espinhos de côr negra, implantados em tubérculos mais ou menos circulares, também negros; idênticos os cinco pares de falsas-patas, existentes do 3.º ao 6.º segmentos abdominais e no anal; são claras, com uma faixa escura no terço basal; em sua extremidade distal há uma nítida corôa de pequenos ganchos negros; último segmento torácico e os dois primeiros abdominais mais escuros que os restantes. Continuam a alimentar-se apenas do parênquima, permanecendo gregariamente.

3.º instar — Segunda ecdíse três dias após a primeira. O colorido geral mantêm-se o mesmo. Nenhuma modificação nos hábitos.

4.º instar — Terceira ecdíse três dias após a segunda. Hábitos ainda gregários. Colorido sensivelmente modificado; pele de fundo pardo-castanho, com pintas brancas em todos os segmentos, com exclusão do primeiro toráxico e do anal, cuja côr é pardo-clara; nestes dois citados segmentos perduram as placas quitinosas de côr pardo-negra. Alimentam-se ainda unicamente do parênquima.

5.º instar — Quarta ecdíse três dias após a terceira. O colorido é o mesmo da fase anterior. Não mais se limitam a alimentar-se do parênquima; devoram a fôlha, inclusive as partes celulósicas. Continuam gregárias.

6.º instar — Quinta ecdíse, que é a última, verificada quatro dias após a quarta. Abandonam a vida gregária.



Xanthopastis timais (CRAM.): Fig. 1 — Ovo, fortemente aumentado; figs. 2-3 — Lagarta, vista lateral e dorsalmente; figs. 4-5 — Crisálida, ventral e dorsalmente, aumentada; fig. 6 — Adulto, muito aumentado. Original.

Ao atingir seu pleno desenvolvimento, a lagarta ostenta o comprimento máximo de 45 a 50 mm; largura de cerca de 6 mm, tomada no terceiro segmento torácico (figs. 2 e 3). Cabeça sub-elítica, globosa, de 3 mm de largura, de côr alaranjada escura, levemente brilhante, com pêlos negros, erétos e dispersos; apresenta quatro manchas negras, duas ao lado da implantação das antênas, as duas outras nos lados externos dos ramos do Y invertido que forma a sutura mediana. Nas duas manchas próximas à base das antênas, estão situados os océlos, em número de 6. Vértice convéxo. Fronte de forma triangular, limitada pela base do clípeo e pelos ramos descendentes da

sutura mediana. Antênas situadas ao lado da área ocelar, internamente, implantadas sôbre uma potuberância globosa de côr clara; têm 3 artículos, sendo o basal mais curto e mais largo que os demais, o primeiro e o segundo de côr clara, o distal de côr castanho-escura. Na extremidade dêste último está implantado, no bordo externo, um longo pêlo escuro, mais longo que o dobro do comprimento total da antêna; no bordo interno observa-se uma curta cêrda. Clípeo transverso, de côr clara, levemente convexo na margem posterior e concavo na anterior. Labro transverso, bilobado na margem distal, por uma reentrancia mediana bem acentuada, notando-se-lhe, em cada lóbulo, pequenos espinhos dirigidos para a frente; margens laterais arredondadas e alaranjadas, a posterior levemente convexa e de côr negra. Mandíbulas de côr pardo-escura, robustíssimas, fortemente arqueadas e 5-denteadas. Maxilas de côr acastanhada. Palpos maxilares curtos, bi-articulados. Lábio transverso. Paplos labiais obsoletos e glabros.

Corpo mais ou menos cilíndrico, preto-fosco, pintalgado de manchas côr branco-leitosa, algumas levemente azuladas, de diferentes dimensões e irregularmente dispostas. Fazem exceção a êsse colorido os segmentos seguintes: o 1.º torácico, o último abdominal, e o anal. O 1.º torácico, cujo colorido é alaranjado, de tom mais claro que o da cabeça, exibe 16 manchas pardo-negras, sendo as duas superiores as maiores, implantando-se em todas elas um pêlo escuro e longo, excetuando as duas inferiores, isto é, as mais próximas do 1.º par de patas, que são portadoras de dois pêlos. Neste segmento há ausência de tubérculos. O último segmento abdominal, cujo colorido é idêntico ao do 1.º torácico, tem 10 manchas pardo-negras, cada uma das quais com um longo pêlo escuro. O segmento anal, com o mesmo colorido dos dois precedentes, exibe 8 manchas pardo-negras, das quais as anteriores são desprovidas de pêlos, ao passo que as duas posteriores são portadoras de dois. Também existem tubérculos neste segmento. Os segmentos abdominais, com o colorido citado no inicio da descrição do corpo, têm, na parte dorsal, 12 cerdas longas, escuras, todas implantadas em placas quitinosas, pretas, brilhantes.

Estigmas elíticos, pretos, brilhantes, em número de 9 de cada lado, situados no 1.º segmento torácico e do 4.º ao 11.º segmentos. As patas são em número de 8 pares, sendo 3 pares torácicos, em cada segmento correspondente e 5 pares de falsas-patas, situados nos 3.º, 4.º, 5.º e 6.º segmentos abdominais e o último par no segmento anal. As patas torácicas são tri-articuladas; o artículo basal, muito mais largo que os demais, é de colorido pardo-escuro; os dois outros artículos, mais ou menos cônicos, de côr preta, brilhantes, todos êles por-

tadores de espinhos. O artículo distal termina com uma robusta unha recurva. As falsas-patas são de côr alaranjada, com uma mancha negra na sua extremidade externa, de onde saem 3 pêlos. O par anal, da mesma côr, porém com uma extensa mancha latero-posterior, de onde saem 4 pêlos, e mais duas pequeninas, sublaterais, cada qual com um pêlo. Todas as falsas-patas terminam em ventosas, sendo estas marginadas de pequeninos ganchos pardo-negros, brilhantes, recurvos, multisseriais e multiordinais.

Crisálida — Depois de 8 dias de última ecdíse, alimentando-se sempre com espantosa voracidade, as lagartas começam a procurar a terra para preparar a ninfóse.

E' interessante verificar o seu trabalho de preparação da cavidade onde se passará a sua transformação: aos poucos, a lagarta vai afastando pequenos torrões e preparando a galeria onde se ocultará. Leva horas nesse preparo do tunel, alisando-lhe as paredes, alargando-o paulatinamente e aprofundando-o, até nele desaparecer totalmente; uma vez feita a galeria, a lagarta coloca-se com a cabeça voltada para a abertura externa e fecha-a com pequenos torrões e detritos, até obliterá-la completamente. Só então se imobilisa para a crisalidação.

A crisálida (figs. 4 e 5) é movel e tem o comprimento de 22 mm; largura máxima de 7 mm. Seu colorido é castanho-escuro, com manchas pardo-claras, mal delimitadas, em cada segmento; tais manchas correspondem às de côr branca da lagarta. Os segmentos do corpo são perfeitamente limitados por suturas de côr escura, quase negra; sôbre êles, de cada lado, são perfeitamente visiveis 6 estigmas de forma ovalada. O abdomen termina por um processo forte, rugoso, castanho-escuro — o cremaster — de onde partem dois espinhos robustos.

Adulto — Começam a aparecer as mariposas 20 dias após a imersão das lagartas na terra.

O adulto (fig. 6) tem de envergadura 40 mm. O comprimento do corpo é de cerca de 18 mm (♀). Quanto ao macho, mede cerca de 35 mm de envergadura para cerca de 15 mm de comprimento.

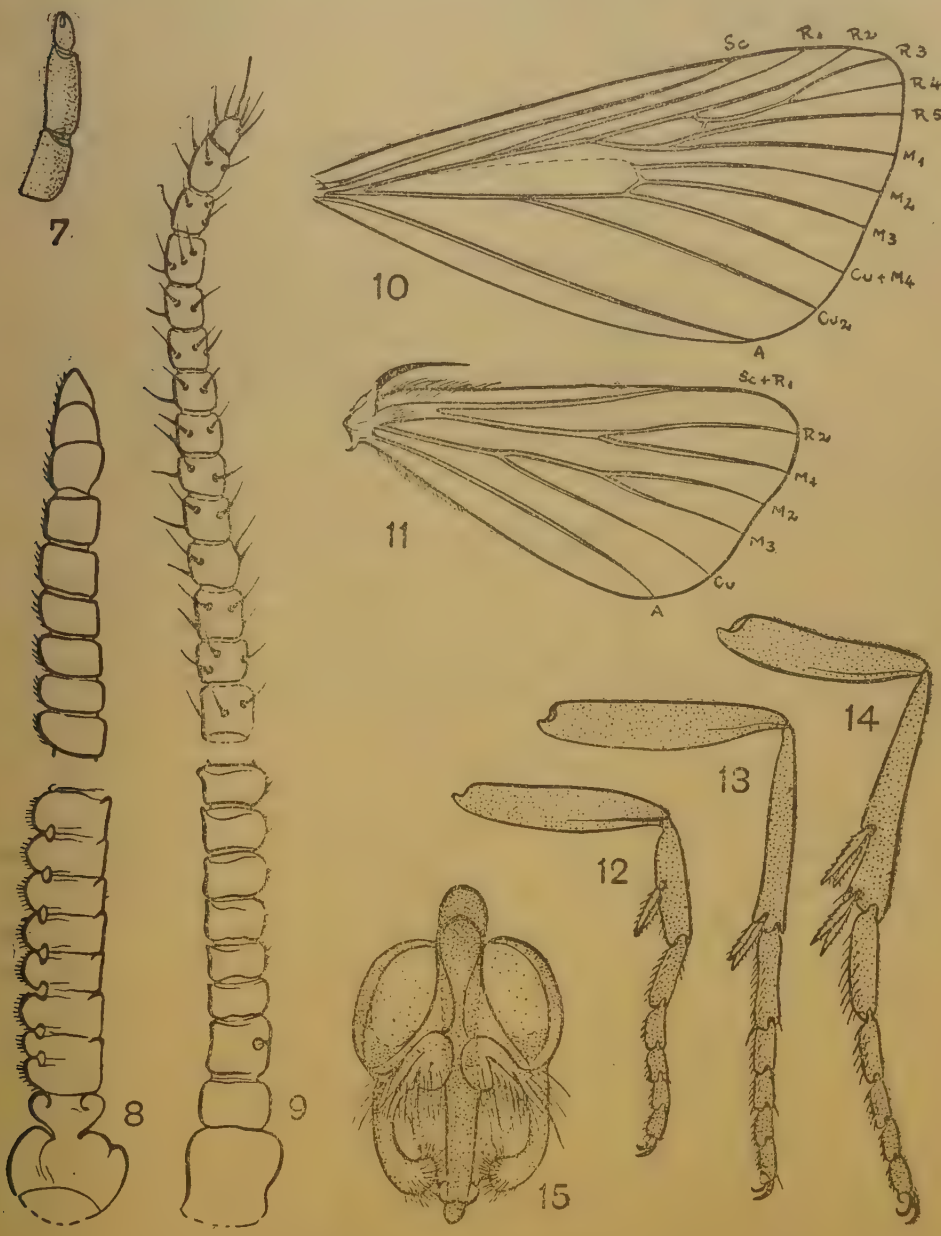
Cabeça com a região frontal de côr amarelo-parda, limitada por pêlos escuros. Palpos labiais de 3 artículos (fig. 7), voltados para cima, inteiramente cobertos de pêlos também escuros. O 1.º artículo medindo cerca de 0,52 mm de comprimento; o 2.º, o maior dos três, de cerca de 0,60 mm, apresentando, como o 1.º, uma tênue curvatura indicando a posição normal; o 3.º e menor de todos, de cerca de 0,25 mm de comprimento, réto, apresentando, próximo ao ápice e voltada para fora, uma pequena fossa concava, ovalada, talvez de função sensorial.

Probóscida bem desenvolvida, de côr amarela, sempre enrolada. Antênas (figs. 8 e 9) longas, finas; no macho, serriadas, de cerca de 8 mm, levemente pubescentes, de côr ferrugínea e com 62 artículos. O artículo basal é de forma globóide; o 2.º, de forma subtriangular, muito menor que o basal; do 3.º em diante, há semelhança morfológica em todos os artículos até mais ou menos o 50.º, apresentando-se todos com uma expansão unilateral dirigida para fora e que forma a serriação aludida; até os 4 últimos artículos, nota-se que êles são mais largos que longos. Entre um e outro artículo, existe como que uma dobra membranosa, observada até o 50.º; pequeninos pêlos notam-se na parte distal ou exterior de cada artículo. Há uma diminuição progressiva de largura do 50.º ao 62.º artículos, os quais se vão afilando para a extremidade da antêna. Os três últimos perdem a expansão lateral que se nota nos anteriores; o antepenúltimo já é mais longo que largo, o penúltimo ainda mais estreito e o último termina de forma cônica .

Na fêmea o aspecto das antênas é bem diferente. Não se nota a serriação forte observada no macho. O número de artículos é de 64. O basal, também mais volumoso que os demais; o 2.º sub-elítico, mais largo que longo; o 3.º mais longo que largo; do 4.º em diante já se nota predominância da largura sôbre o comprimento até mais ou menos o 10.º. Deste até o antepenúltimo, a largura equivale o comprimento. O antepenúltimo é bem mais longo que largo, o mesmo se observando quanto ao penúltimo; o último tem de comprimento cerca do dobro da largura. Nos artículos nota-se uma pequena expansão unilateral, para fora, a partir do 4.º até mais ou menos o 18.º. Essa ordem se inverte do 45.º ao ante-penúltimo, passando a breve expansão a apresentar-se para o lado interno. Entre o 18.º e o 45.º artículos intermediários, não existe nenhuma expansão lateral, o que também é observado nos três últimos. Até o 10.º artículo não se nota a existência de cerdas mas apenas de pequenos pêlos sôbre a expansão lateral que constitue a serriação; do 11.º em diante observa-se a presença de fortes cerdas, 3 ou 4 em cada artículo, com exceção do último, em que existem 10 a 12. Não notamos nenhum órgão sensorial nas antênas. Os olhos são grandes, globósos, salientes e de côr pardo-negra. Um par de océlos pretos, brilhantes, situados no vertex, atraz de cada olho, na base da inserção das antênas.

Corpo de colorido cinza-escuro, com tufos de pêlos cinza-negros, com as extremidades brancas.

Tórax intensamente piloso, com tufos de pêlos de colorido cinza-escuro, também com as extremidades brancas. Patágia com a forma comum, medindo cerca de 2,6 mm de comprimento por cerca de 0,7 mm



Xanthopastis timais (CRAM.): Fig. 7 — Palpo labial do macho, fortemente aumentado; fig. 8 — Artículos iniciais e distais da antêna do macho, muito aumentados; fig. 9 — Artículos iniciais e distais da antêna da fêmea, muito aumentados; figs. 10 e 11 — Asas anterior e posterior do macho, muito aumentadas; figs. 12, 13 e 14 — Patas anterior, mediana e posterior do macho, muito aumentadas; fig. 15 — Genitália do macho, grandemente aumentada. Original.

em sua maior largura e aproximadamente 0.4 na menor, isto é, na sua extremidade distal. Colorido pardo-fosco, com longos pêlos cinza-bronzeados ao longo de sua margem posterior.

Asas anteriores com desenhos de forma variavel, uns de tonalidade rósea com pintas pretas, outros pretos com pintas amarelas; no ângulo humeral, notam-se duas manchas amarelas separadas por uma faixa preta; na região subcostal, existe uma mancha rósea, em cujo centro se nota uma pequenina mancha preta. Mais ou menos na região da célula discoidal, observa-se uma mancha circular de bórdos amarelos, cujo centro é negro. No terço posterior existe uma larga faixa rósea, que acompanha o bórdo interno da asa, dirigindo-se para o bórdo superior; essa faixa é salpicada internamente de pequenas manchas pretas. No bórdo externo há uma série de pequenas manchas amarelas, limitadas externamente por pequenos traços pretos e internamente por manchas da mesma côr e de diferentes tamanhos. Outros desenhos são ainda notados nessas asas. Nervuras características do grupo (fig. 10).

Asas posteriores de colorido cinza-escuro, mais ou menos brilhante, exibindo no bórdo externo uma faixa de côr mais escura; o bórdo externo é limitado, em toda a extensão, por uma franja de pêlos do colorido geral. Inervação característica do grupo. Frênulo forte, curvo, de cerca de 3,8 mm, a base bastante larga, de côr branca, seguindo-se-lhe uma faixa de côr castanho-escura, outra pardo-clara e finalmente o ápice, agudo, também escuro (fig. 11).

Patas de colorido cinza-escuro; as do par anterior atrofiadas em ambos os sexos; as medianas portadoras de um par de epífises tibiais, bem como as anteriores; as posteriores portadoras de dois pares. Tarsos de 5 artículos; em todas as patas o 1.º artículo é bem maior que os demais, por vezes quase igual aos outros 4 reunidos. O tarso termina por um par de unhas de côr parda, robustas e recurvadas.

As pernas do macho têm mais as seguintes características: anterior, com o femur de 3 mm de comprimento; tibia de 2 mm, exibindo epífise mais ou menos em forma de fôlha, articulando-se em sua parte mediana, medindo 0,8 mm; tarso de 3,15 mm, o 1.º artículo medindo 1 mm. Mediana, com femur de 3,5 mm de comprimento; tíbia de 3mm, exibindo 2 epífises distais de 0,5 mm de comprimento; tarso de 3,8 mm de comprimento, tendo o 1.º artículo 1,6 mm. Pata posterior com o femur de 3 mm; tíbia de 3,5 mm, notando-se-lhe dois pares de epífises, o 1.º inserindo-se no terço distal, tendo uma das epífises 0,8 mm e a outra 1 mm; o 2.º par, que é distal, apresenta uma

epífise de 0,6 mm e outra de 1 mm. Tarso de 4,3 mm de comprimento, tendo o 1.º artículo quase 1/3 do comprimento total, ou seja 1,8 mm (figs. 12-14).

Para confronto, daremos a seguir as medidas das patas da fêmea, nem sempre coincidentes com as do macho. Perna anterior: femur de 3,5 mm; tíbia de 2 mm, com o par de epífises articulando-se na região mediana, de cerca de 0,9 mm; tarso de 4 mm, tendo o 1.º artículo 1 mm. Perna mediana, femur de 4 mm; tíbia de 3,5 mm, com o par de epífises articulando-se na extremidade distal, tendo uma epífise 1,2 mm e outra 0,8 mm; tarso de 4,5 mm, tendo o 1.º artículo 1,8 mm. Perna posterior: femur de 2,8 mm; tíbia de 3,5 mm, com 2 pares de epífises, sendo um na altura do terço distal, medindo 0,8 mm e 1,2 mm e outro na extremidade distal, medindo 0,6 mm e 1 mm. Tarso de 4 mm, tendo o 1.º artículo 1,5 mm. Todos os artículos do tarso, em qualquer das pernas, são providas de espinhos na face interna.

Abdomen recoberto de longas escamas cinzentas, o 1.º segmento com pêlos muito longos, da mesma côr, atingindo o 2.º segmento. Último segmento de colorido fulvo, com pequenas escamas de colorido cinza-bronzeado.

Genitália pilosa, deixando entrever, no macho, a porção distal do falosoma; bem desenvolvida e característica, retraída nos últimos segmentos abdominais, aparecendo apenas a sua extremidade. Arpagos voltados para dentro, recobertos de cerdas de colorido castanho. *Uncus* bem desenvolvido, formando, com o *vinculus* e o *sacus*, uma peça única. Falosoma bem desenvolvido, de cerca de 4 mm, tendo a forma de uma lâmina, com a base arredondada e mais larga. Funil bem perceptivel, por onde deslisa o falosoma na sua projeção para o exterior da genitália (fig. 15).

CICLO EVOLUTIVO

O ciclo evolutivo de *Xanthopastis timais* (CRAM.), desde o ovo até o adulto, foi, em média, de cerca de 50 dias. As observações foram feitas desde meiados de junho a meiados de setembro, sob uma temperatura média de 22-23º C, registada em laboratório (meio ambiente). Êsse tempo foi distribuido da seguinte forma, segundo as diversas fases evolutivas do inseto:

Incubação do ovo	5 dias
Vida larval	25 dias
Imersão na terra (prepupa e crisálida) . .	20 dias

E' conveniente observar que todos os períodos assinalados estão sujeitos a alterações, de acôrdo com as variações da temperatura.

Os adultos viveram em média 8-10 dias no laboratório, o que perfaz um ciclo completo de 58-60 dias, desde a oviposição à morte do adulto.

PLANTAS HOSPEDEIRAS

Apezar de termos encontrado a *Xanthopastis timais* depredando *Amaryllis*, spp., planta em que foram criadas três gerações para os estudos que fizemos, é sabido que outras plantas estão sujeitas ao seu ataque, de Norte a Sul do país, podendo ser citadas as seguintes: Açucenas *(Amaryllis*, spp.), Corôa Imperial *(Haemanthus fascinator)*, Estrela do Norte *(Eucharis grandiflora)*, *Clivia*, spp. e *Hippeastrum*, spp.

MEIOS DE COMBATE

Para o combate às lagartas de *Xanthopastis timais*, empregámos pulverizações de arseniato de chumbo, em pó, à base de 300 grs para 100 litros de água, fórmula que não deu o resultado esperado, pois com ela não conseguimos controlar a infestação. À vista disso, adicionámos à suspensão preparada 200 grs de Verde Paris, com o que lográmos êxito absoluto.

Por se tratar de ingrediente extremamente tóxico, recomendamos o maior cuidado possível na sua aplicação, devendo ser evitada pelo operador a aspiração de particulas do inseticida em suspensão no ar, e provenientes do jacto do pulverizador.

NOTES ON "XANTHOPASTIS TIMAIS (CRAM.)" (LEP. NOCT.) PEST OF AMARYLLIDACEAE

Abstract

This paper deals with observations upon biological data on the Noctuidae Xanthopastis timais (CRAM.). This insect is a *pest of Amaryllis spp. and other ornamental plants of the family Amaryllidaceae.*

A control method is also suggested.

BIBLIOGRAFIA

BOURQUIM, F. — 1935 — Metamorfoses de Xanthopastis timais (Cr.). *Rev. Soc. Ent. Argentina*, Buenos Aires. 7: 195-201.

LIMA, A. M. DA COSTA — 1936 — *Terceiro Catalogo dos insetos que vivem nas plantas do Brasil*, 955. Ministério da Agricultura, Rio de Janeiro.

MONTE, O. — 1934 — Borboletas que vivem em plantas cultivadas. Sep. do *Bol. de Agric. Zoot. e Veterinária*. Belo Horizonte. Série agrícola, 21: 111-112.

Vol. 15 — Art. 17 Dezembro de 1944

ALGUMAS ESPÉCIES NOVAS DE COCCÍDEOS DO BRASIL
(HOMOPTERA - COCCOIDEA)

POR

H. S. Lepage e O. Giannotti

Do Instituto Biológico de S. Paulo

Com 32 figuras no texto e estampa 26

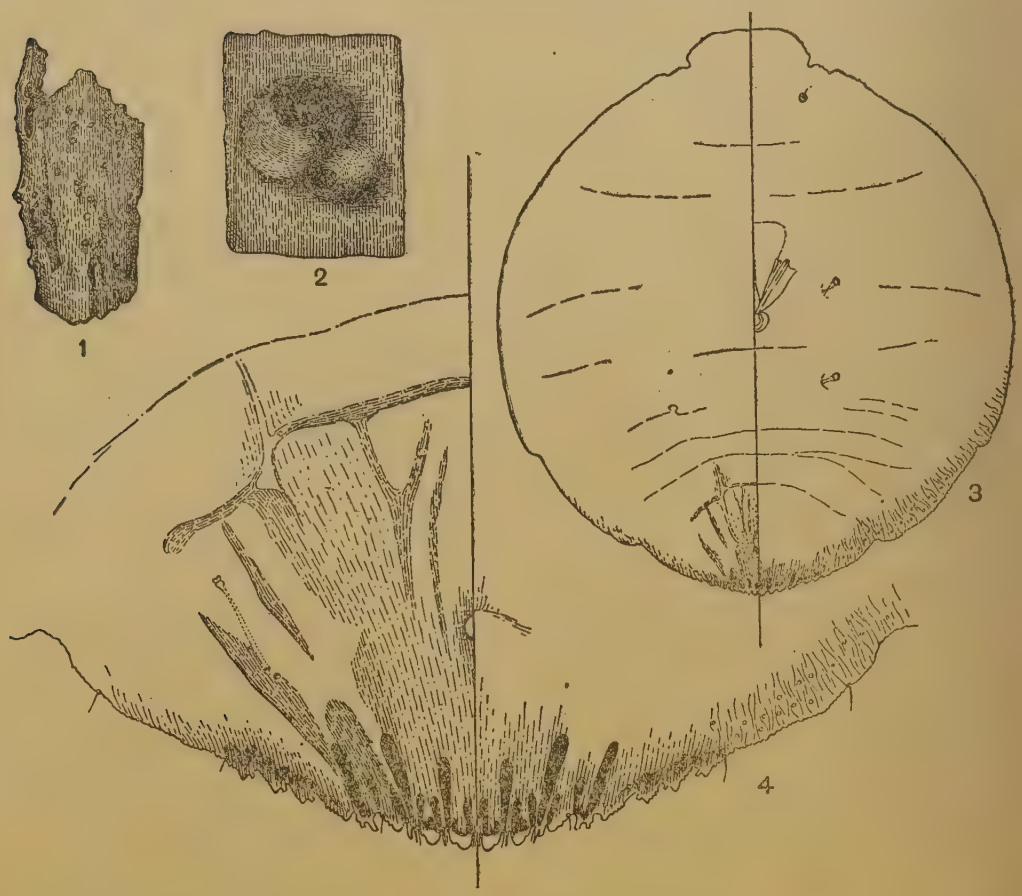
Neste trabalho são descritas três espécies novas de coccídeos, duas da familia *Diaspididae* e uma da familia *Lecaniidae* pertencente ao gênero *Luzulaspis* CKLL., ainda não assinalado no Brasil. Alem destas espécies novas daremos a descrição de *Eriococcus coccineus* CKLL., espécie ainda não assinalada no país e constatada sobre cactaceas.

Mycetaspis Juventinae, sp. n.

Figs. 1 a 4

Corpo da fêmea adulta mais ou menos circular, medindo em lâmina 1,2 milímetros de diâmetro, em média. Margem cefálica apresentando uma expansão anterior arredondada que se torna esclerosada na maturidade. Derme de consistência membranosa com exceção do tubérculo cefálico já referido, e do pigídio. Pigídio pequeno, arredondado, apresentando amplo ângulo obtuso, com quatro pares de lóbulos conspícuos. Lóbulos medianos com pequenas incisões laterais, os do segundo par com uma incisão do lado externo, os do terceiro com duas incisões laterais e os do quarto com a margem externa serreada. Escleroses ou paráfises bem desenvolvidas, apresentando a seguinte disposição de cada lado da linha mediana: uma paráfise curta originando-se no ângulo interno do lóbulo mediano; um curto processo esclerosado no ângulo externo do lóbulo mediano; uma paráfise longo originando-se no espaço interlobular entre o 1.º e 2.º lóbulos; duas paráfises curtas, originando-se uma de cada ângulo dos segundos lóbulos; uma paráfise longa e a mais desenvolvida, originando-se no espaço interlobular entre o 2.º e 3.º lóbulos; uma paráfise curta no ângulo do 3.º lóbulo; uma paráfise longa no espaço entre o 3.º e 4.º lóbulos, e finalmente uma paráfise curta no ângulo interno do 4.º lóbulo. Para além do 4.º lóbulo o pigídio apresenta-se serreado com processos curtos esclerosados. Para além do pigídio, encontram-se nas margens do corpo numerosas glândulas, que se dispõem até a altura do aparelho bucal. Nos espaços interlobulares encontram-se placas de dimensões reduzidas. Anus de pequenas dimensões situado próximo da extremidade do pigídio. Dorso do pigídio apresentando as 3 áreas esclerosadas, típicas do gênero. Ductos dorsais muito longos e finos. Póros perivulvares ausentes. Póros periestigmáticos presentes em pequeno número.

Escudo da fêmea, de côr castanho-escuro, mais ou menos circular, com exuvias centrais ou subcentrais de côr preta. Escudo do macho, menor e alongado.



Mycetaspis Juventinae, sp. n. — Fig 1 - Escudos femininos sôbre tronco de *Erithrina* sp., metade do tamanho natural; — fig. 2 - Escudo feminino, aumentado; — fig. 3 - Fêmea adulta, × 40; — fig. 4 - Pigídio da fêmea adulta, × 155.

Habitat — Encontrado em troncos e galhos de *Erithrina*, sp., no Parque D. Pedro II., Capital de S. Paulo, em 14-2-1944, pelo primeiro autor.

Material típico — Incorporado às coleções deste Departamento e do Departamento de Zoologia do Estado de S. Paulo.

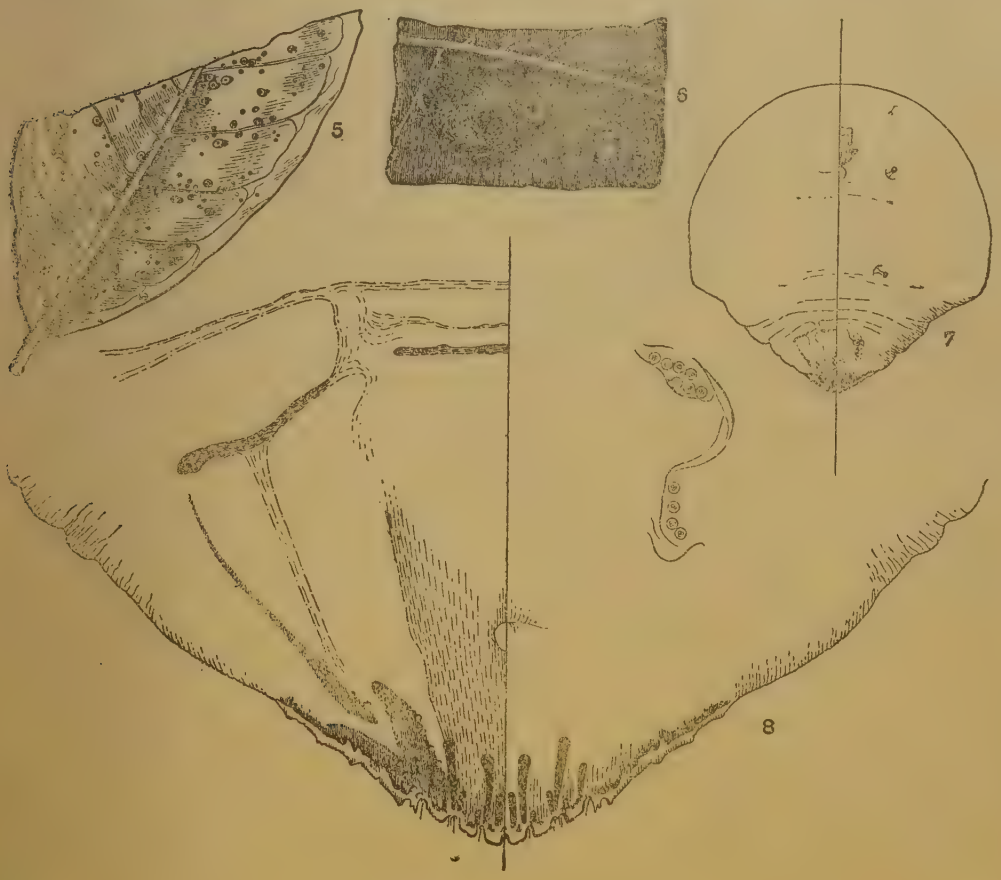
Á Senhorinha Juventina Santos, competente desenhista dêste Departamento, que tem ilustrado os nossos trabalhos, é dedicada esta espécie.

Melanaspis Aristotelesi, sp. n.

Figs. 5 a 8

Fêmea adulta de corpo mais ou menos arredondado, medindo em lâmina 1.00 milímetros de comprimento. Derme membranosa com exceção do pigídio, onde se torna esclerosada. Pigídio longo, com ângulo pouco mais que reto. As três áreas dorsais esclerosadas, apresentando-se como se representa na figura que acompanha esta descrição. Lóbulos pequenos; os dois primeiros pares arredon-

dados, o terceiro par com margem crenulada, e o 4.º apenas representado por um ponto esclerosado. Escleroses ou paráfises em número de cinco pares, distribuidas da seguinte maneira, de cada lado da linha mediana: uma esclerose de tamanho médio originando-se no ângulo interno do glóbulo mediano; uma paráfise longa no espaço interlobular entre o 1.º e 2.º lóbulos; uma paráfise curta no ângulo externo do 2.º lóbulo; uma paráfise longa no espaço interlobular entre o 2.º e 3.º lóbulos; uma paráfise no ângulo externo do 3.º lóbulo. Para além do 3.º lóbulo o pigídio apresenta-se esclerosado na margem e crenulado. Nos ângulos internos



Melanaspis Aristotelesi, sp. n. — Fig. 5 - Escudos femininos, sôbre fôlha de cajueiro, tamanho natural; — fig. 6 - Escudos feminino e masculino, aumentado; — fig. 7 - Fêmea adulta, × 40; fig. 8 - Pigídio da fêmea adulta, × 150.

do 2.º e 3.º lóbulo há dois pequenos processos esclerosados. Póros perivulvares presentes em quatro grupos de número reduzido de póros. Anus situado mais ou menos no centro do pigídio. Ductos dorsais em pequeno número, longos, com abertura na margem da segunda área esclerosada e para além do 3.º lóbulo. Placas pequenas situadas exclusivamente nos espaços interlobulares. Escudo da fêmea mais ou menos circular, medindo 1,4 milímetros de diâmetro, de côr castanho ou cinza, convexo, com exuvia de côr preta central ou subcentral. Escudo ventral branco.

Esta espécie aproxima-se de *M. aliena* (NEWSTEAD), da qual facilmente se separa pelo numero e disposição das paráfises.

Habitat — Encontrado em folhas de cajueiro (*Anacardium occidentalis* L.) no Município de Marechal Deodoro, Estado de Alagôas, pelo Sr. Hermenegildo M. da Cruz. Material enviado pelo entomologista Aristoteles Silva, da Divisão de Defesa Sanitária Vegetal do Ministério da Agricultura, a quem dedicamos a espécie.

Material típico — Incorporado às coleções entomológicas da Divisão de Defesa Sanitária Vegetal do Ministério da Agricultura, sob n.º 6804, e nas coleções deste Departamento.

Gênero *Luzulaspis* COCKERELL, 1902

Signoretia TARGIONI-TOZZETTI, Catalogue, p. 34 (1869); SIGNORET, Ann. Soc. Ent. France (5) 1: 426 (1871); MASKELL, N. S. Trans., 24: 23 (1891); COCKERELL, Can. Entom., 31:331 (1899).

Luzulaspis COCKERELL, Ann. Mag. N. H., (7) 9: 25 (1902).

Genótipo: *Luzulaspis luzulae* (DUFOUR) (= *Aspidiotus luzulae* DUFOUR, 1864).

Em nosso país não havia sido assinalado, até o presente, espécie alguma pertencente a este gênero. Por essa razão daremos a seguir os caracteres deste gênero.

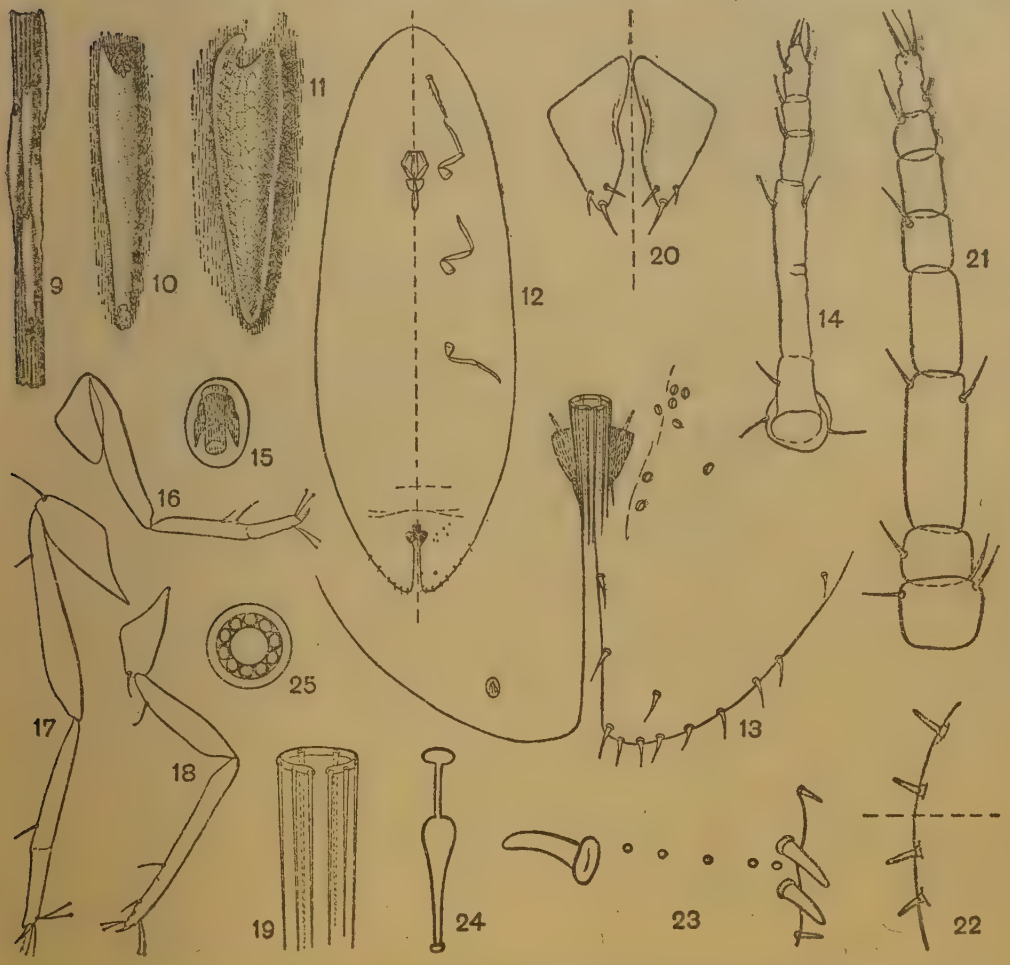
Caracteres — Fêmea adulta muito longa e estreita, com a área cefálica bastante desenvolvida; derme permanentemente membranosa durante toda a vida do inseto; corpo encerrado em um ovisaco feltroso que apenas deixa aparecer a extremidade do corpo; patas finas e longas, e tibia dilatada no ponto de articulação com o tarso; antenas longas, de oito segmentos; placas anais pequenas, com as margens cefalo-lateral e cefalo-caudal de comprimento igual; margens medianas rugosas e apresentando setas; seta marginal pequena; depressões estigmáticas obsoletas pouco pronunciadas; setas estigmáticas em número de 2 ou ausentes; longas setas entre as antenas; ductos tubulares pequenos em ambas as faces do corpo; póros multiloculares na face ventral em carreiras transversais. Larva com antenas de 6 segmentos; pernas normais; anel anal com 6 setas.

Luzulaspis Saueri, sp. n.

Figs. 9 a 25 e estampa 26, fig. *A*

Fêmea adulta de côr amarelada, de corpo achatado, longo estreito, com extremidades arredondadas. Comprimento médio do corpo da fêmea em lâmina, 5 milímetros por cerca de 2 de largura. Região cefálica bem desenvolvida, apresentando antenas longas de 8 segmentos, sendo o terceiro mais longos que os demais. Vários pêlos nos segmentos terminais das antenas.

Margem do corpo apresentando uma carreira de espinhos curtos. Estigmas evidenciados na margem por uma ligeira depressão com 2 espinhos estigmáticos. Margem caudal do corpo apresentando uma incisão anal curta, terminando nas placas anais que são de pequenas dimensões. Placas anais triangulares, apresentando o bordo mediano rugoso. Placas anais apresentando uma longa seta caudal e duas laterais. Anel anal com 8 pêlos. Póros multiloculares na face ven-



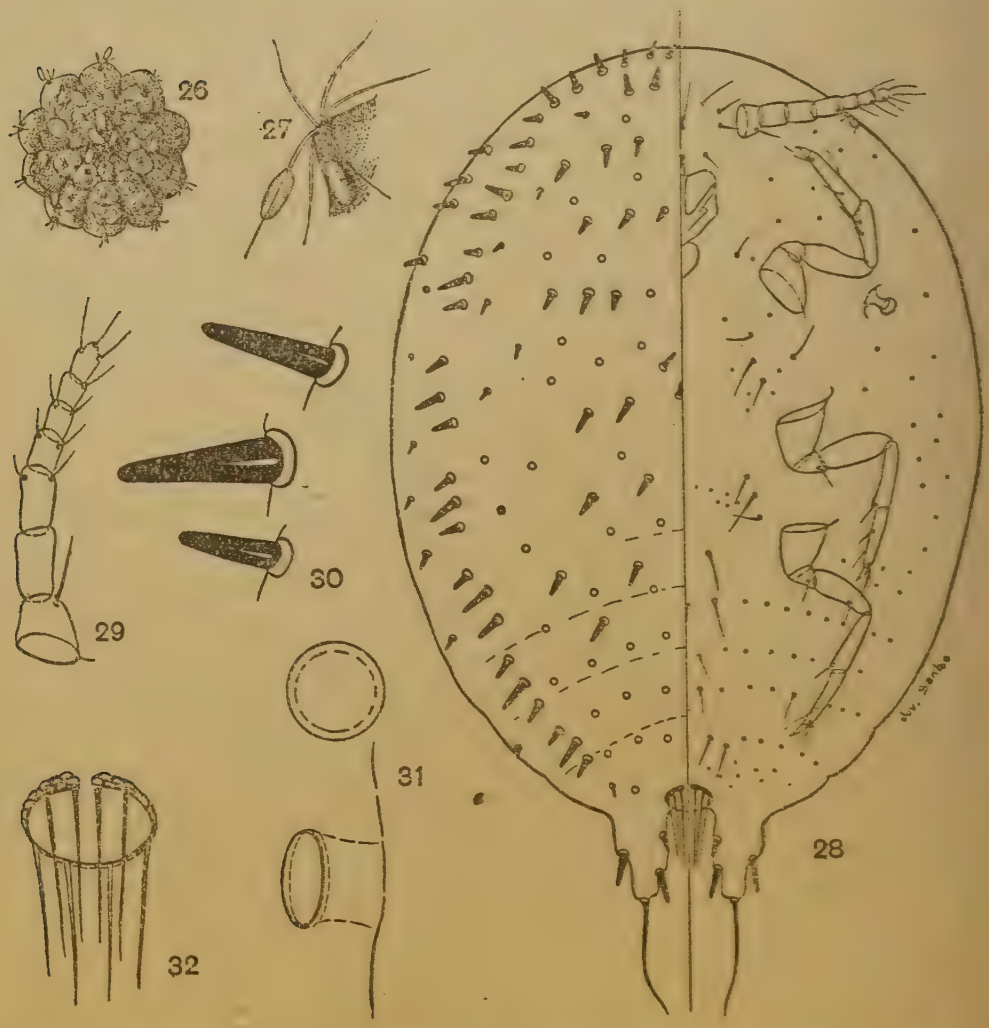
Luzulaspis Saueri, sp. n. — Fig. 9 - Haste de grama silvestre atacada, tamanho natural — fig. 10 - Fêmea com ovos, aumentada; — fig. 11 - Ovissaco, aumentado; — fig. 12 - Fêmea adulta, × 12; — fig. 13 - Extremidade abdominal da fêmea, × 45; — fig. 14 - Antena da fêmea adulta, × 80; — fig. 15 - Detalhe das estruturas dorsais encontradas nas partes cefálica e caudal, × 320; — figs. 16-18 - Patas da fêmea adulta, × 65; — fig. 19 - Orifício anal, × 80; — fig. 20 - Placas anais, × 80; — fig. 21 - Antena de larva, × 320; — fig. 22 - Espinhos da margem do corpo, × 320; — fig. 23 - Espinhos estigmáticos, × 320; — fig. 24 - Glândulas tubulares, × 320; — fig. 25 - Discos glandulares, × 320.

tral do corpo. Ductos tubulares em ambas as faces do corpo. Corpo da fêmea adulta encerrado em um ovisaco branco, de aspéto feltroso, medindo cerca de 1 centímetro de comprimento, com uma extremidade aberta e por onde se vê a extremidade cefálica do corpo.

Larva com aspéto semelhante ao da fêmea com antenas de 6 segmentos, patas bem desenvolvidas e anel anal com 6 pêlos.

Habitat — Encontrado sôbre grama silvestre em Cunha, Estado de São Paulo, pelo Dr. HENRIQUE G. SAUER, a quem dedicamos a espécie.

Material típico — Incorporado ás coleções entomológicas do Departamento de Defesa Sanitária da Agricultura (Instituto Biológico).



Eriococcus coccineus CCKLL. — Fig. 26 - Plantinha atacada, tamanho natural; — fig. 27 - Fêmeas, aumentadas; — fig. 28 - Fêmea adulta, × 42; — fig. 29 - Antena da fêmea, × 100; — fig. 30 - Espinhos dorsais, × 170; — fig. 31 - Glândulas dorsais, × 360; — fig. 32 - Orifício anal, × 110.

Tendo examinado material de cactáceas de colecionadores particulares, tivemos a ocasião de constatar, principalmente nas espécies de *Mammillaria* e *Opuntia*, a presença de um coccideo ainda não assinalado no território nacional. Tal coccideo localiza-se de preferência nos espinhos da aludida cactácea, apresentando-se como massas feltrosas, arredondadas, de côr branca. Provavelmente êste coccideo foi introduzido dos Estados Unidos ou do México, em cactáceas recebidas por colecionadores de São Paulo. Trata-se da espécie *Eriococcus coccineus* COCKERELL, assinalada comumente sôbre cactáceas nos Estados Unidos e México.

Dispondo de abundante material, fizemos uma redescrição dêsse coccideo, afim de dar alguns caracteres que não foram citados na descrição original.

Eriococcus coccineus COCKERELL

Figs. 26 a 32 e estampa 26, fig. *B*

1894. Ent. News, 5: 204.

Fêmea adulta completamente encerrada em um ovissaco de côr branca, feltroso, medindo em média 1,7 mm de comprimento, de forma ovóide. Pupário do macho mais ou menos semelhante, porém de menores dimensões.

Fêmea adulta, antes de encerrar-se no ovissaco, de forma oval, de côr avermelhada. Os ovos, de côr alaranjada, são depositados no ovissaco. Fêmea com segmentação distinta. Antenas de 7 segmentos. Pernas bem desenvolvidas. Extremidade abdominal, terminando em 2 conspícuos lóbulos anais de forma mais cilíndrica, terminado por longa seta caudal. Lateralmente os lóbulos apresentam 3 espinhos truncados, sendo 2 na face interna e 1 na externa dos lóbulos. Anel anal com 8 pêlos, sendo 2 mais curtos.

Numerosos espinhos fortes e truncados distribuidos pela face dorsal do corpo, havendo numa carreira junto á margem do corpo e outros espalhados irregularmente pelo dorso. Na carreira marginal, toma uma disposição mais constante de 3 espinhos por segmento, sendo um maior, central, e um menor de cada lado.

Póros circulares dispostos irregularmente, em grande número, sôbre a derme. Póros alongados são encontrados na face ventral, próximo á linha mediana.

Habitat — Encontrado sôbre cactáceas — *Mammillaria*, spp. e *Opuntia*, spp. em São Paulo (Capital) pelo primeiro autor em 10-6-1944.

SOME NEW SPECIES OF BRAZILIAN COCCIDAE (HOMOPTERA-COCCOIDEA)

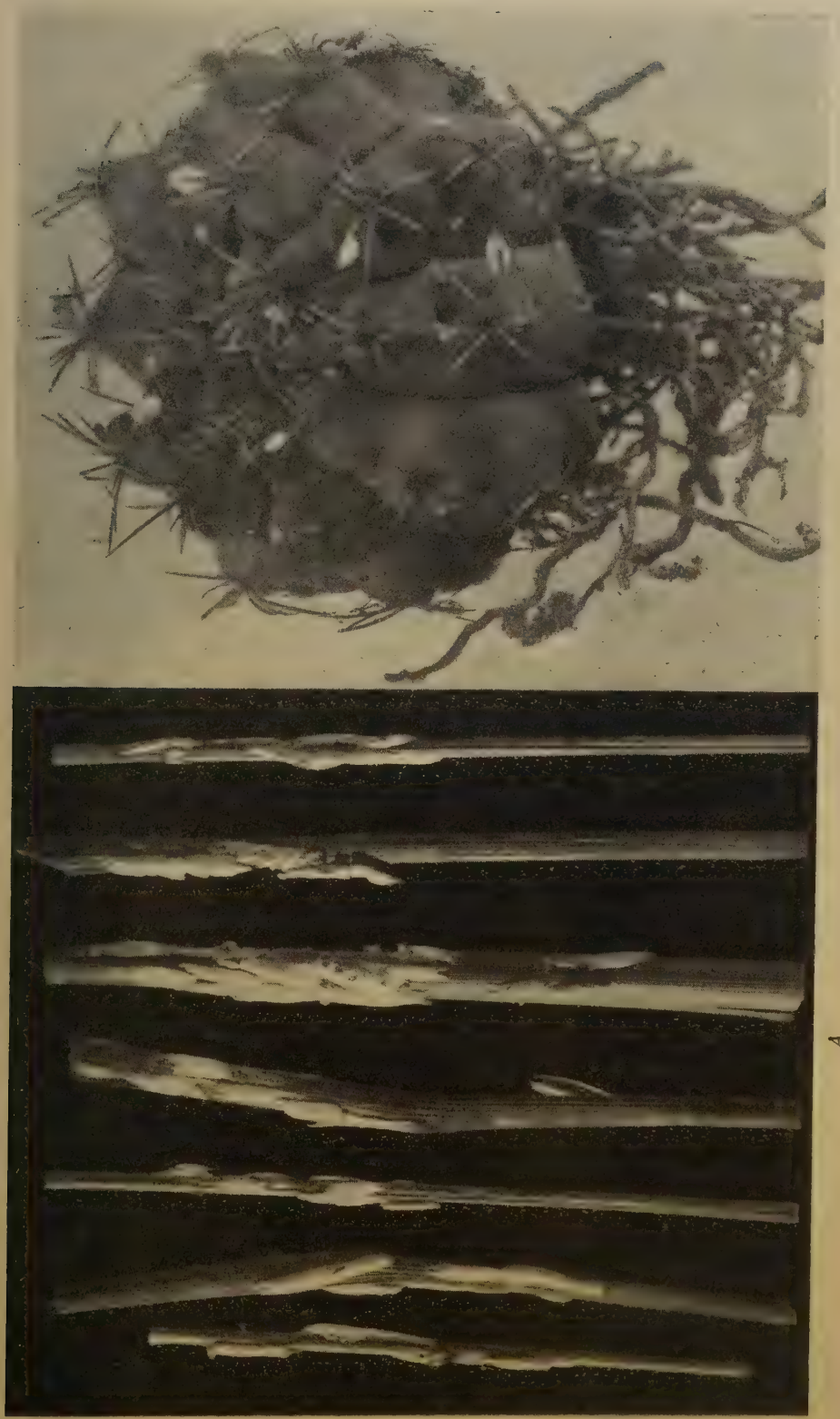
Abstract

In the present paper, the following three species have been described as new to science: Mycetaspis Juventinae, collected in the State of S. Paulo, and Melanaspis Aristotelesi, collected in the State of Alagôas, both of the family Diaspididae; and Luzulaspis Saueri, collected in the State of S. Paulo, of the family Lecaniidae. The last mentioned genus being for the first time noted in Brazil.

Eriococcus coccineus Cockerell, family Coccidae, not hitherto recorded in this country, was found in the State of S. Paulo, and was redescribed.

EXPLICAÇÃO DA ESTAMPA 26

Fig. *A* — *Luzulaspis Saueri*, sp. n., sôbre grama silvestre.
Fig. *B* — *Eriococcus coccineus* Cockerell, sôbre *Mamillaria*.



B

A

Vol. 15 — Art. 18 Dezembro de 1944

SÔBRE UMA PROVAVEL VARIANTE DO VIRUS "Y" DA BATATINHA (SOLANUM VIRUS 2, ORTON) QUE TEM A PECULIARIDADE DE PROVOCAR NECROSES EM PLANTAS DE FUMO

POR

N. R. Nobrega e K. Silberschmidt

Do Instituto Biológico de S. Paulo

Com as estampas 27-29

INTRODUÇÃO

Em trabalho por nós publicado (13, 1941), sôbre os virus encontrados em algumas variedades de batatinha oriundas do Perú, tivemos ocasião de nos referir, à pagina 245, a um virus encerrado por uma planta da variedade denominada Serrana Negra. Os sintomas provocados experimentalmente por êsse virus, em diferentes espécies suscetíveis, lembravam os causados pelo virus Y da batatinha. Outra analogia que haviamos verificado foi o fato do virus por nós pesquisado não infetar *Datura stramonium* L., espécie considerada imune aos virus do grupo Y. O que notamos, porem, no nosso virus, e que diferia do virus Y típico, foi causar êle em todas as plantas de fumo "*White Burley*" sintomas necróticos, principalmente nas nervuras.

Posteriormente levamos a efeito outros ensáios, para averiguar se tais sintomas necróticos em fumo podiam ser de fato atribuidos ao próprio virus Y. Os resultados dos estudos a êsse respeito são expostos no presente trabalho.

HISTÓRICO

Já foram descritas como pertencentes ao grupo do virus Y da batatinha, alguns tipos de variantes que, apezar de semelhantes entre si, provocam nas plantas hospedeiras suscetíveis sintomas até certo ponto distintos dos considerados característicos do tipo descrito por K. M. Smith (17, 1931). A maioria dessas variantes produz em diversas hospedeiras suscetíveis sintomas cloróticos de diferentes gráos de intensidade. A literatura referente a êste grupo de variantes acha-se reunida num trabalho de M. Kramer & K. Silberschmidt (12, 1940). Limitar-nos-emos pois, aqui, a considerar as referências da literatura relativas ao grupo de variantes do virus Y que produzem sintomas "necróticos" em plantas inoculadas de *N. tabacum*, L..

Poucas e incompletas foram as referências que encontramos neste sentido. A. S. COSTA & R. FORSTER (5, 1942), ao estudar uma moléstia do fumo denominada Faixa das Nervuras, causada por um virus pertencente ao grupo do virus Y da batatinha, encontraram pintas necróticas brancas, que consideraram relacionadas com a doença, em certas variedades de fumo do grupo "*Sumatra*" e na variedade "*Turkish.*" No mesmo trabalho, em rodapé, os autores citam uma correspondência recebida dos Estados Unidos do Dr. W. D. VALLEAU, em que êste comunica ter observado os mesmos sintomas das pintas necróticas em plantas de fumo afetadas pelo virus Y, porem somente em plantas do campo.

Outra indicação da literatura a respeito de uma doença dêste grupo, encontramo-la num trabalho de K. M. SMITH & R. W. G. DENNIS (19, 1940), o qual só êste ano chegou às nossas mãos. Nesse trabalho referem os autores que ao estudar uma doença que produzia necroses em fumo "*White Burley*", verificaram, através de inoculações em diferentes solanáceas hospedeiras, que a moléstia produzia necroses apenas em fumo da variedade "*White Burley*". Mesmo entre as plantas desta variedade, inoculadas com o virus em questão, só uma parte apresentava tais sintomas necróticos, enquanto o resto desenvolvia sintomas cloróticos, indistinguíveis dos normalmente causados pelo virus Y. À reação necrótica da doença em fumo os autores deram o nome de "*necrotic phase*" e de "*vein-banding phase*" ao quadro de sintomas semelhante ao do virus Y.

Quando passado para outras espécies suscetíveis de solanáceas, o virus desta doença promoveu unicamente a manifestação da "*vein-banding phase*". Nas retroinoculações executadas para fumo "*White Burley*", a partir destas diversas solanáceas que exibiam a "*vein-banding phase*", manifestou-se, na maioria dos casos, outra vez a fase necrótica.

Os autores verificaram, porem, que algumas espécies se tinham comportado diferentemente a êsse respeito. Inoculando plantas sadias de fumo "*White Burley*" com suco das espécies *Salpiglossis variabilis* HORT. e *Lycopersicum racemigerum*, infeccionadas com a doença, foram observados apenas sintomas cloróticos do tipo do virus Y. Nenhuma das fases, nem a clorótica nem a necrótica, pôde ser obtida, por retroinoculações em fumo, a partir de plantas inoculadas de *Schizanthus retusus* HOOK., *Solanum nodiflorum* JACQ. e *Datura stramonium* L.. Em vista dessas observações e de estudos mais detalhados sôbre as duas fases da doença, SMITH & DENNIS chegaram à conclusão de que a fase clorótica era provavelmente causada por uma variante do virus Y, ao

passo que um virus à parte (*"separate"*) e de carater muito instavel, seria responsavel pela fase necrótica.

As diferenças e os pontos de contato entre o virus por nós estudado e os descritos pelos autores antes citados, serão evidenciados no decorrer do presente trabalho e na parte reservada à discussão.

NOME DA DOENÇA

Como a necrose das nervuras do fumo é o sintoma mais característico da doença que descrevemos nêste trabalho, designaremos daqui por diante, por NECROSE DAS NERVURAS a referida doença encontrada na variedade de batata peruana Serrana Negra.

SUSCETIBILIDADE

Conseguimos facilmente transmitir a Necrose das Nervuras, por meio de inoculações mecânicas, a plantas de fumo, principalmente da variedade *"White Burley"*, e a diversas espécies de solanáceas. Como se pode ver no Quadro 1, as inoculações executadas em plantas de fumo *"White Burley"* deram resultados positivos numa elevada porcentagem de casos. Foi esta variedade de fumo a que mostrou maior suscetibilidade ao virus por nós estudado. Já as plantas das variedades de fumo *"Havana"* e *"Geudertheimer"* se infeccionaram com menor facilidade.

QUADRO 1

Resultados da transmissão da Necrose das Nervuras para plantas sadias de fumo *"White Burley"*

Número de ensáios	Número de plantas	
	Inoculadas	Infetadas
27	150	139

Dentre as outras espécies de solanáceas que usamos nos ensáios de inoculação, houve algumas que desenvolveram nítidos sintomas da doença, enquanto outras, ou se revelaram imunes, ou apresentaram sintomas muito pouco conspícuos. No quadro 2 pode-se verificar qual foi o efeito da inoculação do virus da Necrose das Nervuras em algumas variedades de *N. tabacum* e em outras espécies de solanáceas ensaiadas.

QUADRO 2

Resultados da transmissão da Necrose das Nervuras a plantas sadias de diferentes solanáceas

Plantas com sintomas nítidos	Plantas com sintomas duvidosos	Plantas sem sintomas
Nicotiana Tabacum L. (Var. *"White Burley"*, *"Havana"* * e *"Geudertheimer"* *)		*Datura stramonium* L. °
		Nicandra physaloides (L.) GAERT.
Nicotiana glutinosa L. *	*Petunia* sp.	*Solanum nodiflorum* JACQ.
Nicotiana Langsdorffii VEINM.	*Lycopersicum esculentum* MILL. *	*Nicotiana glauca* GRAH.
Nicotiana longiflora CAV.	(var. *"Marglobe"*)	*Nicotiana rustica* L.

* Resultados positivos nas retroinoculações para fumo *"White Burley"*.
° Resultados negativos nas retroinoculações para fumo *"White Burley"*.

A maioria das espécies que se revelaram suscetíveis ao virus da Necrose das Nervuras em nossos ensáios (Quadro 2) são citadas na literatura como tambem suscetíveis ao virus Y. Devemos, no entanto, mencionar que os autores consideram tambem suscetíveis ao virus Y a espécie *S. nodiflorum*, que em nossos ensáios não se infetou com o virus da Necrose das Nervuras. Como porem não executamos com esta espécie experiências de retroinoculação em fumo, persiste a dúvida a respeito da suscetibilidade de *S. nodiflorum* à doença por nós estudada.

Pelas indicações da literatura, sabemos que a imunidade da espécie *Datura stramonium* ao virus Y da batatinha é considerada muito importante para a caracterização dos virus deste grupo. Por isso julgamos dever destacar o fato de que também nos nossos ensáios com o virus da Necrose das Nervuras, as plantas de *D. stramonium* não chegaram a exibir sintomas de doença (Quadro 3).

Mesmo empregando suco de plantas desta espécie, que não apresentavam sintomas, para inocular plantas sadias de fumo *"White Burley"*, não conseguimos provocar, nestas últimas, qualquer manifestação da doença (Quadro 4).

QUADRO 3

Resultados dos ensáios de inoculação do virus da Necrose das Nervuras em plantas sadias de *Datura stramonium*

Número de ensáios	Número de plantas de *Datura stramonium*	
	Inoculadas	Infetadas
12	92	0

QUADRO 4

Retroinoculação de plantas sadias de fumo *"White Burley"* com suco de plantas de *Datura stramonium* anteriormente inoculadas com o virus da Necrose das Nervuras.

Número de ensáios	Número de plantas de fumo	
	Inoculadas	Infetadas
4	67	0

De todas as observações anteriores pode-se tirar a conclusão de que quanto à suscetibilidade de diversas espécies de solanáceas, ha estreita relação entre o virus da Necrose das Nervuras e os virus do grupo Y.

SINTOMATOLOGIA

A Necrose das Nervuras caracteriza-se, na maioria das espécies suscetíveis, por sintomas semelhantes aos geralmente observados nas doenças do grupo do virus Y e já descritos por K. M. SMITH, (17, 1931) e A. S. COSTA & R. FORSTER (5) para as mesmas hospedeiras.

Somente em plantas de fumo *"White Burley"* é que os sintomas provocados pelo virus da Necrose das Nervuras se distinguem dos causados, na mesma espécie, pelo virus do grupo Y. Limitamo-nos, por isso, à descrição pormenorizada dos sintomas da doença em *N. tabacum.*

SINTOMAS EM FUMO *"White Burley":* O primeiro sintoma que aparece é o esclarecimento de todas as nervuras (*"clearing"*) das fôlhas novas, em geral dentro da primeira semana após a inoculação. Esta manifestação inicial é exatamente igual à causada pelo virus Y em fumo. Em seguida ao esclarecimento das nervuras, nota-se certo escurecimento ou, às vezes, um humedecimento *("water soaking")* geral ou parcial, delas. Êste sintoma evolue depois em uma necrose, que na maioria dos casos atinge as nervuras terciárias e às vezes ocupa áreas relativamente extensas entre estas (estampa 27, fig. A). Esta necrose constitue o sintoma mais característico da doença e pode ser notada tanto na parte superior como inferior do limbo das fôlhas. De vez em quando o tecido situado entre os trechos de nervuras afetadas pela necrose apresenta-se verde escuro e com um pronunciado levantamento (estampa 27, fig. *B*). Com o desenvolver da doença, as fôlhas basais amarelecem rapidamente, e as fôlhas que vão nascendo são de tamanho muitíssimo menor. Esta redução do tamanho do limbo das fôlhas constitue o início de um enfezamento geral das plantas atacadas. As fôlhas novas quase sempre apresentam a necrose das nervuras

apenas na região da ponta. Esta é de côr geralmente mais clara, e mostra um soerguimento do limbo entre as nervuras, o que dá à ponta um aspéto encrespado (estampa 28, fig. *C*). À proporção que as necroses da ponta dessas fôlhas se vão acentuando, notam-se, logo abaixo das necroses, áreas cloróticas junto às nervuras, as quais se transformam logo depois em plaquinhas necróticas. Aparece também, na parte mediana destas mesmas fôlhas, uma clorose entre as nervuras, principalmente terciárias, a qual evolue, em certos casos, em sintomas semelhantes aos denominados "faixas das nervuras" *("vein-banding")* em outras doenças de virus. Estas faixas escuras que ladeiam as nervuras estão sempre associadas às necroses das nervuras e às plaquinhas necróticas da ponta das fôlhas (estampa 28, fig. *C*). Antes de um mês após a inoculação com a doença, as plantas de fumo já apresentam um extremo atrazo *("stunting")* no seu desenvolvimento (estampa 28, fig. *D*). Passadas mais de 4 semanas a partir da data da inoculação, encontram-se, nas fôlhas, numerosas plaquinhas necróticas, esbranquiçadas ou castanhas, sôbre e entre as nervuras. Estas plaquinhas necróticas se distribuem irregularmente nas fôlhas médias e se localizam, preferentemente, na ponta das fôlhas novas (estampa 29, fig. *E*).

Nas variedades de fumo "*Geudertheimer*" e "*Havana*" os sintomas necróticos provocados pelo virus da doença são do mesmo tipo observado em "*White Burley*", porem geralmente mais brandos e não presentes em todas as fôlhas como naquela variedade. O crescimento das plantas se atraza menos e elas exibem nas fôlhas novas necroses limitadas a pequenas zonas do limbo (estampa 29, fig. *F*).

Resumindo, podemos dizer que o virus da doença Necrose das Nervuras provoca, em fumo, sucessivamente três sintomas bem distintos: esclarecimento e necrose das nervuras das fôlhas, e a seguir enfezamento de toda a planta.

Comparemos agora os sintomas da doença por nós estudada com outros sintomas necróticos que encontramos referidos na literatura como sendo provocados por doenças até certo ponto a ela semelhantes.

COSTA & FORSTER (5,1942) descrevem uma doença que, alem dos sintomas cloróticos semelhantes aos causados pelo virus Y, provoca em fôlhas de certas variedades de fumo do grupo "*Sumatra*" e na variedade "*Turkish*" lesões mais ou menos arredondadas, de côr avermelhada a princípio e, mais tarde, brancas, necróticas. Tais lesões geralmente não ocorrem nas fôlhas mais inferiores. Informam ainda êsses autores que a doença produz apenas ligeiras reduções no tamanho da planta ou de suas partes.

Os sintomas necróticos da doença que estudamos diferem dos da relatada por COSTA & FORSTER, em dois pontos principais. Em primeiro lugar, porque a Necrose das Nervuras, como o nome o indica, manifesta-se nas fôlhas, por meio de lesões necróticas mais ou menos lineares, principalmente sôbre as nervuras, e praticamente não apresenta pintas necróticas. Somente na fase final do quadro sintomatológico, a doença por nós estudada provoca necroses irregulares que, grosseiramente, poderiam talvez lembrar as referidas pintas necróticas de COSTA & FORSTER. Outra diferença nítida entre os sintomas das duas doenças é que a que estudamos causa sintomas necróticos em fôlhas das variedades de fumo *"White Burley"* e *"Geudertheimer"*. Nas experiências de COSTA & FORSTER estas mesmas variedades exibiram apenas, sintomas "c l o r ó t i c o s". Infelizmente não empregamos em nossos ensáios as variedades de fumo *"Sumatra"* e *"Turkish"*, usadas por aqueles autores, o que teria permitido ainda melhor comparação dos sintomas atribuidos às duas doenças. Completando a comparação entre as doenças em questão, podemos dizer que, ao contrário da doença descrita por COSTA & FORSTER, a Necrose das Nervuras se caracteriza, normalmente, por sintomas necróticos nas fôlhas mais inferiores das plantas de fumo e por uma redução acentuada da planta toda.

Quanto aos sintomas descritos por SMITH & DENNIS (19, 1940) para a doença necrótica que encontraram em fumo da variedade *"White Burley"*, acreditamos existir, sem duvida alguma, entre esta doença e a por nós estudada, uma semelhança acentuada. A analogia maior que há entre ambas é que elas afetam a mesma variedade de fumo, causando, nesta, reações necróticas muito semelhantes. Pelo menos se analizarmos uma fotografia publicada no trabalho daqueles autores, notamos necroses se dilatando a partir das nervuras das fôlhas e que, até certo ponto, lembram os sintomas observados numa das fases finais da doença que estudamos.

Como SMITH & DENNIS acentuam, as necroses da doença que estudaram podem ser facilmente confundidas com as do quadro sintomatológico da doença produzida pelo complexo dos virus X + Y. Com efeito, também no curso da doença por nós pesquisada, observamos uma fase em que os sintomas se assemelham aos da mencionada doença complexa. Devemos porém frizar que os sintomas iniciais da doença Necrose das Nervuras, isto é, o esclarecimento e a necrose das nervuras, são constantes e assaz distintos, de modo que não achamos provavel que eles possam passar desapercebidos ou confundidos com outros sintomas. Já que SMITH & DENNIS, na descrição embora sumária do quadro sintomatlógico, não se referem a estas manifestações tão cara-

terísticas, não temos, baseando-nos apenas nos sintomas, elementos para considerar idêntica à Necrose das Nervuras a doença descrita por esses autores.

ENSÁIOS SÔBRE A TOLERÂNCIA DO VIRUS DA NECROSE DAS NERVURAS "IN VITRO" A DIVERSOS FATORES EXTERNOS

Em consequência da dificuldade que encontramos em diferenciar a doença Necrose das Nervuras de outras doenças afins, baseando-nos apenas no quadro sintomatológico das plantas afetadas, julgamos necessário estudar também a tolerância do virus *"in vitro"* a diversos fatores externos. Esperavamos obter, desta maneira, elementos mais precisos para a correta classificação do virus em questão. Os resultados destas experiências, que se acham resumidos no Quadro 5, serão expostos nos parágrafos seguintes, cada um dos quais abrange os ensáios relativos a um dos fatores examinados.

1 — PONTO TERMAL DE INATIVAÇÃO

Os resultados dos ensáios de inoculação em fumo da variedade *"White Burley"*, mostraram que o suco prensado de uma planta doente, contendo o virus da Necrose das Nervuras e conservado em tubo de vidro de paredes delgadas, perde a atividade infecciosa quando é submetido, em banho maria, à temperatura de 58° C. durante 10 minutos (Quadro 5).

Como julgássemos, pelos ensáios anteriores, que a doença por nós estudada pudesse pertencer ao grupo das causadas pelo virus Y, achamos interessante comparar o resultado a que chegáramos, com os valores do ponto termal de inativação do virus Y, referidos na literatura. Ha certa discrepância nas indicações dos diversos autores a respeito do ponto termal de inativação do virus Y. Enquanto K. L. KOCH (7,1933) considera como ponto de inativação do virus pelo calor a temperatura de 60° C., encontramos em E. KOEHLER, (11,1940), para o referido ponto de inativação, a indicação de 58° C. K. M. SMITH (18,1937), no entanto, chega à conclusão de que o virus Y já perde a atividade na temperatura de 52° C.

Embora os dados de KOCH e SMITH para os limites da tolerância do virus Y *"in vitro"* estejam ligeiramente diferentes do ponto termal do virus da Necrose dos Nervuras, já a referência de KOEHLER, para o mesmo virus Y, coincide inteiramente com a do nosso virus.

Julgamos, portanto, que o virus por nós pesquisado, com o seu ponto termal de inativação de 58° C., pode ser incluido dentro dos limites de tolerância dos virus do grupo Y. Dentro dêste grupo tam-

bém cabe, porém, o virus da doença Faixa das Nervuras do fumo, descrita por COSTA & FORSTER (5, 1942) que tem o ponto termal de inativação de 54-55° C. O virus da doença necrótica em fumo descrita por SMITH & DENNIS (19, 1940) que provou inativar-se numa temperatura de 50° C., estaria porém, um pouco abaixo dos limites estabelecidos por KOCH (7) e SMITH (18) para o ponto termal de inativação do virus Y.

2 — PONTO FINAL DE DILUIÇÃO

O suco prensado de plantas atacadas pela doença Necrose das Nervuras, diluido na proporção de 1:1.100 partes de água distilada, perdeu sua infetividade quando inoculado em plantas sadias de fumo *"White Burley"* (Quadro V).

Se compararmos a Necrose das Nervuras, no tocante à esta qualidade, com as doenças do grupo do virus Y, podemos nos aproveitar das observações que KOCH & JOHNSON (8, 1935) realizaram a respeito dêste virus. Estes autores chegaram à conclusão de que, em casos excepcionais, o virus Y pode resistir à diluição de 1:5.000. K. M. SMITH (18), por outro lado, verificou que o virus Y raramente produz infecção em diluições além de 1:1.000. Por êste fato julgamos que a doença por nós estudada mostra uma tolerância à diluição muito próxima da verificada por SMITH para o virus Y. A doença necrótica estudada por SMITH & DENNIS (19), que tem o ponto final de diluição de 1:800, mostra, pois, uma tolerância à diluição, cuja ordem corresponde, aproximadamente, à citada por SMITH para o virus Y. Já a doença descrita por COSTA & FORSTER (5) difere, a êste respeito, das outras duas antes citadas, pois o suco de plantas que contem êste virus se manteve ativo até numa diluição de 1:10.000, tendo evidenciado, portanto, uma tolerância muito maior do que a dos outros virus aqui considerados.

3 — PONTO FINAL DA LONGEVIDADE "IN VITRO"

Os nossos ensáios a êste respeito são muito incompletos. O que podemos dizer é que o suco prensado de plantas afetadas com o virus da Necrose das Nervuras deixou de se mostrar infeccioso, quando inoculado em plantas sadias, após a conservação, em ampolas, à temperatura de laboratório, durante 8 dias (Quadro 5). Êste limite da longevidade não está longe do estabelecido na literatura para os virus do grupo Y. Os autores que consultamos e que estudaram a longevidade dos virus do grupo Y, embora todos lhes atribuam uma tolerância limitada à conservação " *in vitro*", são discordes a respeito do

exato número de dias necessários à sua total inativação. K. M. SMITH (18) acha que o virus Y por êle estudado se mantem ativo, no laboratório, durante 24-36 horas. L. K. JONES & C. L. VINCENT (6, 1937) verificaram a inativação de um virus do grupo Y, só após 4-6 dias de conservação de laboratório. Como se vê, também a respeito desta qualidade, ha grande semelhança entre o virus da Necrose das Nervuras e os virus do grupo Y.

Referindo-nos às doenças que causam reações necróticas no fumo, estudadas por SMITH & DENNIS (19) e COSTA & FORSTER (5), verificamos que também os virus causadores dessas doenças têm limites de tolerância *"in vitro"* comparáveis com os estabelecidos pelos dois autores citados, para o virus Y. Assim, o virus pesquisado por SMITH & DENNIS mostrou, após 24 horas de conservação *"in vitro"*, uma diminuição de atividade, e o de COSTA & FORSTER manteve-se infeccioso ainda após uma conservação *"in vitro"* durante 72 horas.

4 — PONTO FINAL DE RESISTÊNCIA AO DESSECAMENTO

O suco preparado de fôlhas sêcas em herbário, de fumo *"White Burley"* atacado pela Necrose das Nervuras, já não provocou sintomas de doença em plantas sadias da mesma variedade de fumo. Resultado semelhante foi obtido por K. M. SMITH (18) relativamente ao virus Y. Pelo menos êste autor refere-se ao fato do virus Y ser inativado pelo dessecamento. Já outros autores, porém, atribuem ao virus Y uma grande resistência ao dessecamento. L. K. JONES & VINCENT (6, 1937) informam que o virus Y permanece ativo depois de um período de dessecamento de 17-50 dias. G. BURNETT (4, 1934) num extenso trabalho dedicado ao estudo da longevidade do virus Y, diz que êle permaneceu infetivo em tecidos de fumo e batatinha por um prazo de 50 dias. Refere ainda aquele autor que o mesmo virus se manteve ativo em tecido de tomateiro apenas durante 17 dias.

Não podemos comparar a resistência ao dessecamento do virus da Necrose das Nervuras com os das doenças descritas por SMITH & DENNIS (19) e COSTA & FORSTER (5) porque esses autores não incluiram em seus ensáios a prova de resistência dos respectivos virus ao dessecamento.

5 — PONTO FINAL DE RESISTÊNCIA AO ALCOOL

O suco prensado de plantas doentes de fumo *"White Burley"* com a Necrose das Nervuras ainda foi capaz de transmitir a doença a plantas sadias de fumo da mesma variedade, depois de 2 horas e meia de contacto com partes iguais de alcool 50%. A partir de 3 horas,

QUADRO 5

Resultados dos ensáios sôbre a tolerância do virus da Necrose das Nervuras, *"in vitro"*, a diversos fatôres externos.

Ponto termal de inativação			Ponto final de diluição			Ponto final de longevidade *"in vitro"*			Ponto final de resistência ao alcool		
Temperatura (C)	N.º de ensáios	Relação entre o número de plantas inoculadas e infetadas	Diluição do suco (água distilada)	N.º de ensáios	Relação entre o número de plantas inoculadas e infetadas	Número de horas de conservação do virus *"in vitro"*	N.º de ensáios	Relação entre o número de plantas inoculadas e infetadas	Número de horas de contato entre o suco e alcool 50%	N.º de ensáios	Relação entre o número de plantas inoculadas e infetadas
45º	1	6/4	1:1	3	22/22	0	7	35/35	0	5	26/23
50º	1	6/6	1:10	1	4/4	18	1	5/4	½	1	5/4
55º	2	13/5	1:100	1	4/3	24	2	8/6	1	4	18/9
56º	3	20/11	1:200	1	10/4	48	4	18/3	1½	5	23/12
57º	5	28/10	1:400	2	15/4	60	2	10/6	2	4	18/8
58º	5	28/0	1:500	1	5/2	72	3	13/8	2½	1	3/1
59º	4	23/0	1:600	3	20/5	96	1	3/1	3	2	3/0
60º	5	25/0	1:700	2	10/3	120	1	5/1	3½	1	3/0
61º	2	8/0	1:800	2	15/0	144	1	3/1			
62º	2	8/0	1:900	4	18/5	168	1	3/1			
63º	1	8/0	1:1.000	8	45/9	192	1	5/0			
			1:1.100	4	18/0	240	1	5/0			
			1:1.200	4	18/0						

porém, o virus perdeu a sua atividade (Quadro 5). K. L. KOCH (7, 1933) descreve um virus do grupo Y que se mostrou infetivo ainda meia hora, após ser misturado com alcool 50%, inativando-se todavia depois de uma hora de contacto. Considerando a relativamente pequena diferença que desta maneira existe entre a doença por nós estudada e a referida nas indicações de KOCH, queremos acreditar que, também nesta propriedade, a Necrose das Nervuras está em concordância com as doenças de virus do grupo Y. Queremos frizar, no entanto, que dispomos de dados incompletos a respeito da resistência do nosso virus ao alcool 50%.

A doença necrótica de COSTA & FORSTER (5) não foi estudada quanto à sua resistência ao alcool. Já SMITH & DENNIS (19), a respeito do virus que encontraram e que produzia necroses em fumo, dizem que êle perdeu usualmente a capacidade de infecção, depois de estar exposto durante 1 hora ao alcool a 50%.

Resumindo os resultados dos nossos ensáios relativos à tolerância "*in vitro*" do virus da Necrose das Nervuras a diferentes fatôres externos, podemos dizer que êles corroboram a hipótese da existência de uma grande semelhança entre êste virus e os do grupo Y da batatinha. Quanto aos virus responsáveis pela doença Faixa das Nervuras, estudada por COSTA & FORSTER, e a doença necrótica pesquisada por SMITH & DENNIS, êsses já demonstraram certas diferenças de tolerância a alguns fatôres externos, quando em comparação com o nosso virus.

ENSÁIOS DE TRANSMISSÃO DO VIRUS DA NECROSE DAS NERVURAS POR MEIO DE INSETOS (*)

Em vista dos resultados dos ensáios anteriores terem revelado grande analogia entre o virus da Necrose das Nervuras e o virus Y da batatinha, resolvemos examinar ainda a possibilidade de outra eventual semelhança entre êles. Assim, foram realizadas algumas experiências de transmissão por meio de insetos, que incluiram duas espécies que tinham sido utilizadas por KOCH (7, 1933) na transmissão do virus Y, isto é, os afídeos *Myzus persicae* SULZ. e *Macrosiphum solanifolii* ASHM.

A técnica descrita em seguida e empregada para a transmissão do virus da Necrose das Nervuras por meio de insetos, foi a mesma para as duas espécies de afídeos por nós ensaiados. Êstes insetos foram criados durante algumas gerações em plantas de

(*) Todos os ensáios foram executados pelo Sr. *A. Orlando*, da Seção de Fisiologia Vegetal, a quem nos manifestamos gratos pelos valiosos dados fornecidos.

Rhaphanus raphanistrum L., *Sinapis alba* L. e *Datura stramonium* L., espécies consideradas não suscetíveis ao virus Y. Mais tarde, grande número dêles em diferentes estádios de desenvolvimento, foi daí transferido para tubos de vidro. Em tais tubos os afídeos permaneceram, em jejum, durante um período que variou entre 3 a 4 horas e meia. Passado êsse tempo, os afídeos foram retirados dos vidros e colocados sôbre fôlhas destacadas de fumo "*White Burley*" doente, as quais apresentavam sintomas típicos da Necrose das Nervuras. O prazo dentro do qual os afídeos ficaram alimentando-se nas fôlhas destacadas variou entre 5 e 60 minutos. Em seguida a essa fase da alimentação dos afídeos sôbre as fôlhas doentes, grupos de 30-50 dêsses insetos foram retirados das fôlhas e colocados sôbre plantinhas novas de fumo sadio "*White Burley*". Revelaram-se mais adequadas para êste tipo de ensáio, plantas de fumo providas de 3 a 4 fôlhas iniciais.

As duas espécies de afídeos utilizadas nos ensáios de transmissão do virus da Necrose das Nervuras provocaram a doença típica nas plantas sadias de fumo "*White Burley*". Queremos notar que apenas numa série os insetos conseguiram colonizar nestas plantas. Os resultados são dados separadamente, para as duas espécies de afídeos estudadas.

a) *Myzus persicae* SULZ.

Os exemplares de *Myzus persicae* tornados presumivelmente infectivos, depois de submetidos à técnica antes descrita, transmitiram de fato a Necrose das Nervuras a todas as 19 plantinhas sadias de fumo "*White Burley*" que tinham sido infetadas com êles. O aparecimento dos sintomas se deu já a partir da primeira semana. Estes sintomas eram iguais ou dificilmente distinguíveis dos causados pela inoculação mecânica do virus da Necrose das Nervuras em plantas sadias de fumo.

SMITH & DENNIS (19), cujo trabalho tivemos ocasião de citar repetidamente, também tinham feito tentativas para reproduzir em plantas sadias de fumo "*White Burley*", por meio do *Myzus persicae*, os sintomas necróticos da doença que estudavam. Em suas experiências aqueles autores verificaram que o *Myzus persicae* apenas transmitiu ao fumo a fase "clorótica" da doença, sem jamais provocar os sintomas necróticos, que haviam suscitado o nosso maior interêsse.

Comparando os resultados relativos à nossa doença com os obtidos por SMITH & DENNIS, deve-se levar em consideração que a técnica adotada na transmissão do virus da Necrose das Nervuras diferiu, até certo ponto, da seguida pelos referidos autores. A diferença consistiu principalmente no fato de terem SMITH & DENNIS colonizado os afídeos

infetivos sôbre as plantas a serem infeccionadas, ao passo que, em nosso caso, os afídeos infetivos ficaram sôbre as plantas a serem infeccionadas durante apenas alguns dias. Possivelmente a técnica de transmissão da nossa doença também foi diversa da de SMITH & DENNIS, por terem sido no nosso caso os afídeos alimentados, após prévio jejum, sôbre fôlhas destacadas de plantas doentes e daí, minutos depois, transferidos para plantas sadias.

Não acreditamos, porém, que as grandes discrepâncias verificadas entre o modo de transmissão das duas doenças possam ser atribuidas apenas a uma pequena variação no método de pesquisa. Ao contrário, queremos crer que SMITH & DENNIS, mesmo seguindo a sua técnica, teriam igualmente obtido sintomas necróticos, se porventura tivessem executado as experiências com o mesmo virus que nós estudamos.

2) *Macrosiphum solanifolii* ASHM.

Também foi conseguida a transmissão do virus da Necrose das Nervuras para plantinhas sadias de fumo "*White Burley*" por meio do afídeo *Macrosiphum solanifolii* ASHM.

Dentre as 15 plantinhas de fumo que foram infestadas com afídeos tornados préviamente infectivos, segundo a técnica descrita anteriormente, apenas quatro chegaram a exibir sintomas, os quais eram típicos da Necrose das Nervuras. Os referidos sintomas de caráter necrótico correspondem aos normalmente provocados por inoculações mecânicas em fumo "*White Burley*" com a mesma doença.

Ao estudar a transmissão da sua doença por meio do *Macrosiphum solanifolii*, SMITH & DENNIS verificaram que êste afídeo promovia nas plantas sadias de fumo "*White Burley*" somente a fase "clorótica" da doença.

Ante a relativa facilidade com que nos ensáios de transmissão com a Necrose das Nervuras ambos os insetos provocaram, nas plantas infestadas, sintomas necróticos, queremos acreditar que existe notavel diferença, com relação ao modo de transmissão, entre o virus da nossa doença e o da de SMITH & DENNIS. Não podemos a êste respeito comparar o virus da Necrose das Nervuras com o da Faixa das Nervuras descrito por COSTA & FORSTER (5), porque estes não executaram ensáios de transmissão por meio de insetos.

RELAÇÕES DE IMUNIDADE ENTRE O VIRUS DA NECROSE DAS NERVURAS E O VIRUS Y DA BATATINHA

Nas nossas experiências destinadas a verificar uma possível proteção do virus da Necrose das Nervuras contra o virus Y, e vice-

versa, procuramos seguir em traços gerais a técnica já usada com sucesso por E. KOEHLER (10, 1938).

Inoculamos, cada vez, grupos de 5 plantinhas de fumo *"White Burley"*, com suco contendo o virus da Necrose das Nervuras, e assim que os sintomas dêste começavam a se manifestar, reinoculamos as plantas com o virus Y padrão. Já em outro grupo de 5 plantas de fumo sadio *"White Burley"* aplicamos primeiro o virus Y, e, mais tarde, inoculamos as mesmas plantas com a Necrose das Nervuras.

Deixamos em cada ensáio, para fins de comparação, grupos correspondentes de plantas de fumo, inoculados, separadamente, apenas com um dos dois virus que pretendiamos ensaiar.

Os resultados de todos êstes ensáios podem ser resumidos no seguinte:

Ao passo que as plantas inicialmente inoculadas com o virus da Necrose das Nervuras não apresentavam alterações características dos sintomas, após a sua reinoculação com o virus Y, as plantas originalmente tratadas com êste virus reagiram ainda à posterior inoculação com o virus da Necrose das Nervuras, exibindo os sintomas necróticos desta doença.

Assim, os resultados dos nossos ensáios não nos permitem tirar conclusões positivas a respeito da existência de uma recíproca proteção baseada em relações de imunidade, entre os virus Y e o da Necrose das Nervuras.

Também nas experiências de SMITH & DENNIS (19), concernentes ao mesmo teste, as plantas de fumo *"White Burley"*, antes inoculadas com o virus Y e mais tarde friccionadas com suco contendo o virus da *"necrotic phase"*, patentearam, às vezes, os sintomas típicos desta doença. Parece não haver, pois, a êste respeito, fundamental diferença entre as nossas observações e as de SMITH & DENNIS.

DISCUSSÃO

I — TENTATIVA DE IDENTIFICAÇÃO DO VIRUS DA NECROSE DAS NERVURAS

Analizando os resultados dos diferentes ensáios relatados nos parágrafos anteriores, somos levados a admitir que o virus por nós estudado deve pertencer ao grupo Y da batatinha.

Há porém uma diferença marcante entre o virus da Necrose das Nervuras e o virus Y padrão de SMITH (17, 1931). Enquanto êste último virus produz apenas sintomas cloróticos nas plantas sadias de fumo, o virus da Necrose das Nervuras promove, geralmente, nesta espécie, o aparecimento de necroses. Devido à esta particularidade do

nosso virus, julgamos dever enquadra-lo entre as variantes do virus Y que provocam sintomas necróticos em *Nicotiana tabacum*.

Como já mencionamos na parte dedicada ao histórico, foi descrita por COSTA & FORSTER (5, 1942) uma doença de virus, denominada Faixa das Nervuras e pertencente às do grupo Y, que provocava em fumo lesões necróticas brancas, tanto na variedade *"Turkish"* como em algumas variedades do grupo *"Sumatra"*. Tais sintomas necróticos não foram observados pelos referidos autores na variedade *"White Burley"*. Por outro lado, nas variedades de fumo indicadas por COSTA & FORSTER como reveladoras dêste caráter necrótico, as lesões apresentavam uma forma arredondada e encontravam-se, de preferência, nas fôlhas superiores.

Já que a Necrose das Nervuras se caracteriza por necroses lineares, bastante discerníveis também nas fôlhas basais, principalmente da variedade *"White Burley"*, não acreditamos que os dois virus aqui comparados sejam completamente idênticos.

Esta nossa suposição é apoiada também por algumas discrepâncias relativas a certas qualidades de ambos os virus *"in vitro"*. Queremos, por exemplo, pôr em destaque que o virus da Faixa das Nervuras se mostrou ainda ativo numa diluição de 1:10.000, ao passo que o virus da Necrose das Nervuras já perde a atividade numa diluição de 1:1.100.

Maior semelhança dos sintomas é a que se pode verificar entre a nossa doença e a de caráter também necrótico, encontrada em fumo *"White Burley"* por SMITH & DENNIS (19, 1940). Nesta exposição, referir-nos-emos apenas à manifestação necrótica desta doença à que os citados autores deram o nome de *"necrotic phase"*, e que chamaremos, daqui por diante, de doença de SMITH & DENNIS.

Embora não sendo dada na publicação de SMITH & DENNIS, uma descrição detalhada da fase necrótica da doença em fumo *"White Burley"*, podemos verificar, todavia, na fotografia que ilustra o trabalho, uma grande semelhança entre o quadro sintomatológico desta doença e os sintomas tardios por nós observados em plantas infeccionadas com o virus da Necrose das Nervuras. O ponto comum entre as doenças que aqui estamos comparando é o fato de ambas provirem de plantas de batatinha e provocarem sintomas necróticos bastante semelhantes, unicamente em *Nicotiana tabacum*.

Em outros aspectos, porém, as doenças aqui analizadas apresentam algumas diferenças acentuadas. Assim, por exemplo, SMITH & DENNIS insistem no caráter assaz instavel dos sintomas necróticos da doença, ao passo que nos nossos ensáios com fumo *"White Burley"*

o quadro da Necrose das Nervuras não sofreu, no curso de numerosas repicagens com centenas de plantas, com a exceção de um único ensáio, nenhuma alteração. Podemos pois afirmar que o virus por nós estudado apresenta um comportamento bastante estavel quanto ao seu caráter necrótico.

Certas diferenças foram também encontradas entre as duas doenças no tocante à sua transmissão por meio de insetos. Nos ensáios de transmissão efetuados com a nossa doença e que incluiram os afídeos *Myzus persicae* SULZ. e *Macrosiphum solanifolii* ASHM., evidenciou-se, nas plantas com êles infestadas, sempre o quadro típico da doença, isto é, uma nítida necrose das nervuras. Estes resultados não correspondem aos a que tinham chegado SMITH & DENNIS, quando estudaram a transmissão da sua doença por meio dos mesmos vetores que posteriormente foram utilizados nos estudos da Necrose das Nervuras. Nas experiências dos mencionados autores, as plantas que se infeccionaram pelos afídeos apenas exibiram sintomas de caráter "c l o r ó t i c o", os quais eram diferentes dos das plantas que serviram de fóco para os insetos.

Passando agora à comparação das qualidades dos dois virus *"in vitro"*, podemos dizer que eles concordam, até certo ponto, quanto à sua tolerância, relativamente limitada, a altas diluições (aproximadamente 1:1.000). Por outro lado, o virus da Necrose das Nervuras tem limite de tolerância ao calor sensivelmente mais elevado (58° C.) do que o da doença de SMITH & DENNIS (50° C.). Também a respeito da longevidade *"in vitro"*, o virus descrito por SMITH & DENNIS diferiu do da Necrose das Nervuras por inativar-se depois de 24 horas, contrastando assim, com o nosso virus, que permaneceu ativo mesmo após 7 dias de conservação.

Infelizmente, da referida doença necrótica do fumo, SMITH & DENNIS limitaram-se a dar uma exposição apenas sumária, baseada em resultados de ensáios nos quais foi incluido pequeno número de plantas. Achamos possível, por isso, que possa haver, entre as duas doenças, analogias mais estreitas do que as que por ora somos levados a admitir. Considerando porém os elementos fornecidos pelo sucinto trabalho de SMITH & DENNIS, devemos supôr que as duas doenças, apezar de terem muitos pontos em comum, não são totalmente idênticas.

Incluimos até agora, nesta discussão como comparáveis com o virus da Necrose das Nervuras, apenas as variedades do virus Y, que provocam sintomas necróticos em *Nicotiana tabacum*. Julgamos porém interessante nos referir aqui ainda a um virus que nos parece

apresentar certa semelhança com o da Necrose das Nervuras, embora não produza sintomas necróticos em fumo. Trata-se do virus causador de uma doença do mosáico do pimentão (*Capsicum frutescens* L.), descrito por A. ROQUE & J. ADSUAR (15, 1941). Esta doença, cujo quadro sintomatológico em fumo "*White Burley*" não foi descrito por êsses autores, caracteriza-se em outras variedades de fumo e em diversas espécies de solanáceas, por sintomas cloróticos (esclarecimento das nervuras e faixa das nervuras), muito semelhantes aos considerados caraterísticos do virus Y. Apenas na variedade "*Large Bell Hot*", de pimentão, êsse virus produziu, dentro de 5-6 dias, uma necrose sistêmica das nervuras, seguida de desfolhamento, necrose das hastes e morte da planta. E' especialmente a semelhança entre êste sintoma e o observado em fumo "*White Burley*" infeccionado pelo nosso virus, que nos levou a analizar aqui também o virus do mosáico do pimentão, descrito por ROQUE & ADSUAR. Assim como o nosso virus, também o agente causador do mosáico do pimentão provocou sintomas em *Nicotiana glutinosa* e *Lycopersicum esculentum*, e não infetou *Datura stramonium*. Outra analogia, aliás, como sabemos, de valor relativo, entre as duas doenças, consiste no fato de ambas poderem ser transmitidas pelo afídeo *Myzus persicae* SULZ. Finalmente os dois virus apresentam pontos termais de inativação muito próximos.

Por outro lado, o virus do mosáico do pimentão já se inativa à uma diluição de 1:100 e resiste apenas dois dias à conservação "*in vitro*". A respeito destas duas propriedades o nosso virus apresenta, pois, maior gráo de tolerância.

Embora ROQUE & ADSUAR não tenham chegado a uma classificação do virus por eles pesquisado, é de supôr que também êsse virus venha a constituir uma variante do virus Y, a qual porém não coincide perfeitamente com a do virus causador da doença que estudamos.

Resta-nos ainda encarar a possibilidade de ser a Necrose das Nervuras causada por um dos complexos de virus, conhecidos como responsáveis pela manifestação de severos sintomas necróticos em batatinha. Entre êsses complexos, o mais estudado é o constituido pelos virus X e Y da batatinha (*Solanum virus* 1, Orton e *Solanum virus* 2, Orton). No caso da Necrose das Nervuras, porém, temos fortes razões para excluir o virus X como componente de um eventual complexo. Isto porque, nos nossos numerosos ensáios de inoculação de *Datura stramonium* com o virus da Necrose das Nervuras, nunca foi verificado o mais ligeiro sintoma de doença (Quadros 3 e 4), apezar de constituir a mencionada espécie uma planta hospedeira "indicadora" do virus X.

Pelas razões já expostas, acreditamos que também o complexo X + A (*Solanum virus* 1, Orton + *Solanum virus* 3, Murphy & M'Kay) não pode ser considerado como causador da Necrose das Nervuras.

Além disso, ficam praticamente excluidos, também, todos os complexos, nos quais entram como componentes o virus do mosáico do fumo (*Nicotiana* virus 1, (Mayer) Allard) ou o virus do mosáico do pepino (*Cucumis virus* 1, Doolittle), pois a sua presença seria facilmente verificada durante as experiências, uma vez que ambos têm qualidades físicas bem diferentes das do virus por nós pesquisado. E' verdade que nunca se pode afastar completamente a possibilidade de ser a doença que estudamos, produzida por um complexo de dois ou mais virus, cuja interação em batatinha ou fumo seja ainda pouco conhecida. Por motivos de caráter mais geral achamos, todavia, pouco provável que a suposição da natureza complexa da Necrose das Nervuras chegue a ser provada. Queremos citar, a propósito, o fato de não termos geralmente observado diferenças acentuadas entre os sintomas da doença, provocados por inoculação com sucó normal do virus ou por suco submetido a condições externas logo abaixo dos limites de tolerância dêsse virus. Êste comportamento difere, nitidamente, do atribuido aos complexos de virus, nos quais a ação de intensidades externas de fatôres externos tende a eliminar o componente mais fraco (E. KOEHLER, 9, 1937). Uma vez que nos nossos ensáios com o virus da Necrose das Nervuras não foi verificada nenhuma eliminação de um possível "componente", achamos poder concluir das nossas experiências que o virus por nós estudado não é de natureza complexa, mas representa uma variante distinta do grupo do virus Y da batatinha, e, além disso, diferente das que submetemos neste trabalho a uma apreciação comparativa.

II — CONSIDERAÇÕES A RESPEITO DA IMPORTÂNCIA FITOSSANITÁRIA DA NECROSE DAS NERVURAS E DE OUTRAS DOENÇAS DE VIRUS DA BATATINHA NO PERÚ

Até agora só nos ocupamos com a identificação do virus encontrado em uma planta da variedade de batatinha peruana "Serrana Negra".

Devemos considerar, ainda, a importância que o estudo e a pesquisa de um virus encerrado por uma variedade de batatinha semi-selvagem, proveniente do Perú, podem trazer para o conhecimento do estado fitossanitário da cultura desta solanácea naquele país.

Assim, poderão ser completados os resultados publicados no nosso trabalho anterior (12), no qual comunicamos ter também encontrado o virus X (*Solanum virus* 1) em plantas de algumas variedades

peruanas de batatinha. Achamos que estudos desta natureza, que visam a identificação das doenças de virus das batatinhas nativas das regiões andinas, podem tornar-se de grande utilidade, visto que as referências de literatura que encontramos, são muito gerais e pouco precisas.

Limitando-nos aqui, exclusivamente, às indicações relativas às doenças de virus observadas em culturas de batatinha no Perú, verificamos que E. V. ABBOTT (1, 1929 e 2, 1931) se refere à ocorrência das enfermidades de virus "mosaico fraco","enrolamento" e "*spindle tuber*", naquele país, sem contudo entrar em detalhes quanto ao método de diagnose que adotou. Mais tarde C. VARGAS (20, 1936), em uma monografia dedicada à cultura da batatinha no Perú, trata, à pag. 6, apenas das doenças "mosaico" e "enrolamento", sem especificar os virus responsáveis pelo aparecimento de tais moléstias (*). Num estudo mais recente, T. B. BARDUCCI & R. B. GUERRERO (3, 1943) põem em evidência os danos consideráveis que as doenças de virus causam às culturas de batatinha na região de Canta, atribuindo especialmente à ocorrência dessas doenças o resultado pouco animador da produção dessa solanácea. Também encontramos no relatório sôbre os trabalhos experimentais executados durante o ano de 1941 na Estação Experimental de La Molina (14, pag. 65), referências ao prejuizo que a doença "mosaico" causou nas culturas de diversas variedades de batatinha, organizadas na referida Estação, destacando porém a relativa resistência de duas variedades peruanas ao mosaico, o que contrastava com a grande suscetibilidade à esta doença apresentada por algumas variedades importadas no Canadá. Estas indicações da literatura, por mais valiosas que sejam, não permitem uma comparação exata de todas as doenças de virus observadas no Perú com as descritas em outros países produtores de batatinha. Isto se deve ao grande número de virus que, ou separadamente, ou em complexo, podem provocar doenças do tipo "mosaico" e também ao conceito nem sempre uniforme das outras denominações de doenças de virus, principalmente se baseadas apenas na sintomatologia. Considerando a estreita relação existente entre a exata determinação de uma doença e os meios de combate, achamos de grande importância que seja intensificado, ainda mais, o estudo, pelos métodos de identificação desenvolvidos na Virologia, dos virus encerrados pelas batatinhas nativas da zona dos Andes.

(*) Indicações bastante precisas sôbre alguns virus encerrados por diversas variedades de batatinhas peruanas estão contidas numa publicação de R. W. G. DENNIS (Notes on the photoperiodic reactions and virus contents of some Peruvian potatoes — 1939 — *Ann. Appl. Biol.*, 26: 87-101) que só tivemos ocasião de consultar durante a impressão deste trabalho.

O citado autor não encontrou qualquer variante do virus Y, infeccionando as variedades de batatinhas peruanas estudadas.

Há porém outra razão por que atribuimos certa importância a êstes estudos: é o fato de grande parte dos geneticistas, que se ocupam com trabalhos de melhoramento da cultura da batatinha em diversos países terem nutrido a esperança de encontrar na região de origem da batatinha, isto é, justamente nos Andes, espécies de *Solanum* ou variedades de *Solanum tuberosum* resistentes às principais doenças de virus. Parece que, dentro de certos limites, as tentativas de encontrar tais grupos sistemáticos de plantas resistentes às doenças de virus e ao mesmo tempo geneticamente compatíveis com as variedades comerciais de batatinha, foram coroadas de êxito. Assim pelo menos R. N. SALAMAN (16, 1938), mencionando a resistência a certas doenças de virus atribuidas por pesquisadores russos à espécie *Solanum Rybinii*, exalta o valor extraordinário que um tal material resistente pode representar para futuros trabalhos genéticos.

Mas a ocorrência, numa determinada zona geográfica, de espécies de *Solanum* resistentes a alguns virus, absolutamente não exclue a possibilidade de que muitas outras espécies de *Solanum*, ou mesmo variedades de *Solanum tuberosum*, encerrem virus também nessa zona.

Achamos necessário encarar a possibilidade da ocorrência simultânea, nos países andinos, de "batatinhas" resistentes e suscetíveis às doenças de virus, para logo dissipar a suposição errônea de que a qualidade de "resistência" venha a ser um caráter peculiar a todas as variedades de batatinhas provenientes dos países andinos.

A êste respeito, os resultados do nosso trabalho não deixam dúvida de que há também variedades semi-selvagens de batatinhas, no Perú, que encerram até variantes bastante fortes de virus. E' verdade que nos nossos ensáios não estudamos o efeito desse virus sôbre a própria batatinha, mas observamos os sintomas provocados, pela inoculação com êste virus, em plantas de *Nicotiana tabacum, N. glutinosa* e outras solanáceas.

ON A SUSPECTED VARIANT OF THE POTATO VIRUS "Y" (*Solanum virus* 2, ORTON) WHICH CAUSES NECROSIS ON TOBACCO PLANTS

Abstract

1) Detailed information are given in this paper about further studies carried out with a virus disease detected by the AA. in a plant of the Peruvian potato variety Serrana Negra (13, 1941). This disease is named in the present paper "Necrose das Nervuras".

2) The most distinctive character of the disease is the development of a severe necrosis on healthy tobacco plants 1-2 weeks after their inoculation. The necrotic symptoms are generally limited almost entirely to the smaller veinlets (Plate 27, fig. A). Later on the diseased tobacco plants become also strongly stunted (Plate 28, fig. D). The tobacco variety "White Burley" proved to display these necrotic symptoms in a very characteristic way.

3) From the tobacco plants showing the necrotic symptoms, we succeeded in transmitting, by sap inoculation, only a chlorotic disease to the solanaceous species Nicotiana tabacum *L.*, N. glutinosa *L.*, N. Langsdorffii *Weinm.*, N. longiflora *Cav., and* Lycopersicum esculentum *Mill., which are known to be susceptible to the potato virus Y (Tables 1 and 2). On the other hand, the species* Datura stramonium *L., that is immune to the Y virus, could not be infected with the virus of the "Necrose das Nervuras" (Tables 3 and 4).*

4) Completing the observations of the symptom-expression of the disease by a study of the properties "in vitro" of its causal agent, we found the physical qualities of the virus rather similar to those of the Y-virus group. In our tests on the limits of tolerance of the expressed sap of the virus against various external factors we obtained the following results: The virus showed to have a thermal death point of 58° C., lost its infectivity at dilutions superior to 1:1.000, remained active "in vitro "during 7 days, survived — added to alcohol 50% — until 2½ hours and was destroyed by desiccation (Table 5).

5) We were successful in transmitting the virus by means of the aphids Myzus persicae *Sulz. and* Macrosiphum solanifolii *Ashm., to healthy tobacco plants, which developed the characteristic necrotic symptom-pattern of the disease (pg. 318-320).*

6) The cross-immunity test between our virus and a chlorotic strain of the potato virus Y did not give conclusive results on "White Burley" *tobacco plants (pg. 321).*

7) In the first part of the Discussion we draw a comparison of the qualities of our virus with viruses resembling our own, and described by other authors. In this attempt to a preliminary classification of the virus of the disease named "Necrose das Nervuras", we came to the conclusion, that it must be considered as a special strain of one of the viruses of the potato virus Y group. Our virus is principally characterized by the production of necrotic symptoms on tobacco plants.

8) In the second part of the Discussion we report on some references of the literature about virus diseases affecting the potato

crop in Perú. In view of the scanty information on the subject available up to the present time in the literature, we call the attention to the importance and need of future identification of potato viruses occurring in that country and in other parts of the Andean zone, famous center of origin of the edible potato tubers.

BIBLIOGRAFIA

1 — ABBOTT, E. V. — 1929 — Diseases of economic plants in Perú. *Phytopath.*, 19: 645-656.

2 — ABBOTT, E. V. — 1931 — Enfermedades de las plantas cultivadas en el Perú. *Est. Experimental Agric. de La Molina*, Circ. N.º 18, 76 pp.

3 — BARDUCCI, T. B. y R. B. GUERRERO — 1943 — Estado actual del cultivo de la papa en la provincia de Canta. *Est. Experimental Agric. de La Molina*, Informe N.º 56, 15 pp.

4 — BURNETT, G. — 1934 — The longevity of the latent and vein-banding viruses of potato in dried plant tissue. *Phytopath.*, 24: 215-227.

5 — COSTA, A. S. e R. FORSTER — 1942 — Nota sôbre a moléstia de virus do fumo denominada faixa das nervuras. *Bragantia*, 2: 55-76.

6 — JONES, K. and C. L. VINCENT — 1937 — The susceptibility of potatoes to the vein-banding virus. *J. Agric. Res.*, 55: 69-79.

7 — KOCH, K. L. — 1933 — The nature of potato rugose mosaic. *Phytopath.*, 23: 319-342.

8 — KOCH, K. L. and J. JOHNSON — 1935 — A comparison of foreign and american viruses. *Ann. Appl. Biol.*, 22: 37-54.

9 — KOEHLER, E. — 1937 — Fortgeführte Untersuchungen mit verschiedenen Stämmen des X-virus der Kartoffel (Ringmosaik-virus). *Phytopath. Zeitschr.*, 10: 31-41.

10 — KOEHLER, E. — 1938 — Vergleichende Untersuchungen über die Ausbreitungsgeschwindigkeit verschiedener Stämme des X-Mosaik-Virus in der Tabakpflanze. *Zeitschr. f. Pflanzenkr.*, 48: 118-128.

11 — KOEHLER, E. — 1940 — Weitere Studien über die Vira der Y-Gruppe der Kartoffel. *Phytopath. Zeitschr.* 12: 480-489 (resumo em *Rev. Appl. Myc.*, 19: 489).

12 — KRAMER, M. e K. SILBERSCHMIDT — 1940 — A "faixa das nervuras", uma doença de virus do fumo encontrada no Estado de São Paulo. *Arq. Inst. Biol.*, S. Paulo, 11: 165-188.

13 — NOBREGA, N. R. e K. SILBERSCHMIDT — 1941 — Estudo sôbre o estado sanitário de algumas variedades de batatinhas peruanas. *O Biológico*, 7: 243-248.

14 — PÁEZ, J. — 1941 — in *14.ª Memória de la Estación Experimental Agricola de La Molina correspondiente al año 1941*, Lima — Perú, 276 pp.

15 — ROQUE, A. and J. ADSUAR — 1941 — Studies on the mosaic of peppers (Capsicum frutescens) in Puerto Rico. *J. Agric. of the Univ. of Puerto Rico*, 25: 40-50.

16 — SALAMAN, R. N. — 1938 — The present state and future development of potato breeding. *Indian J. Agric. Sci.*, 8: 119-129.

17 — SMITH, K. M. — 1931 — On the composite nature of certain virus diseases of the mosaic group. *Proc. Roy. Soc. B*, 109: 251-267.

18 — SMITH, K. M. — 1937 — *A textbook of plant virus diseases.* 615 pp., J. and A. Churchill Ltd. edit., London.

19 — SMITH, K. M. and R. W. G. DENNIS — 1940 — Some notes on a suspected variant of Solanum virus 2 (potato virus Y). *Ann. Appl. Biol.*, 27: 65-70.

20 — VARGAS, C. — 1936 — El Solanum tuberosum a través del desenvolvimiento de las actividades humanas. Tesis, 73 pp. Imprenta del Museo Nacional, Lima, Perú.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Estampa 27

Fig. *A* — Fôlhas de fumo *White Burley*, de diferentes idades, de planta inoculada com o virus da Necrose das Nervuras, apresentando necroses limitadas de preferência às nervuras de 3.ª ordem. Notam-se na terceira fôlha à direita necroses que ocupam áreas relativamente extensas entre as nervuras. (Foto França).

Fig. *B* — Fôlhas basais de plantas de fumo *Withe Burley* inoculadas com o virus da Necrose das Nervuras, exibindo além da necrose das nervuras o tecido levantado e de côr mais escura entre as nervuras terciárias. (Foto França).

Estampa 28

Fig. *C* — À esquerda — Fôlhas novas de fumo *White Burley* infeccionado com a Necrose das Nervuras que apresentam no ápice, de matiz mais claro, necrose sôbre e entre as nervuras. As pontas das fôlhas têm um aspecto encrespado. À direita vê-se uma fôlha média de fumo *White Burley* que exibe, na parte mediana, sintomas cloróticos do tipo faixa das nervuras ("vein-banding") e na ponta lesões necróticas. Material colhido de planta de fumo *White Burley* inoculada mecanicamente com o nosso virus. (Foto França).

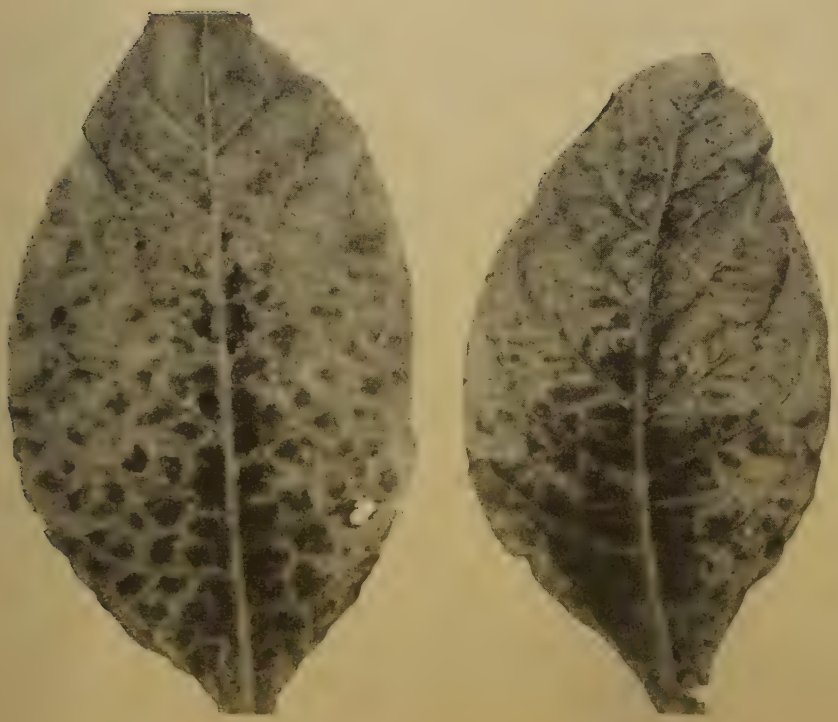
Fig. *D* — Planta de fumo *White Burley* atacada pela Necrose das Nervuras, à esquerda de uma planta sadia da mesma variedade. Chama atenção o extremo enfezamento ("Stunting") da planta doente. (Foto França).

Estampa 29

Fig. *E* — Sintomas tardios da Necrose das Nervuras em fôlhas de fumo *White Burley*, representados por numerosas plaquinhas necróticas, esbranquiçadas ou castanhas. Tais necroses ocorrem sôbre e entre as nervuras e se distribuem irregularmente pelo limbo das fôlhas. (Foto França).

Fig. *F* — Fôlha média de fumo *Geudertheimer* apresentando as necroses das nervuras características da doença por nós estudada naquela variedade suscetivel. (Foto França).

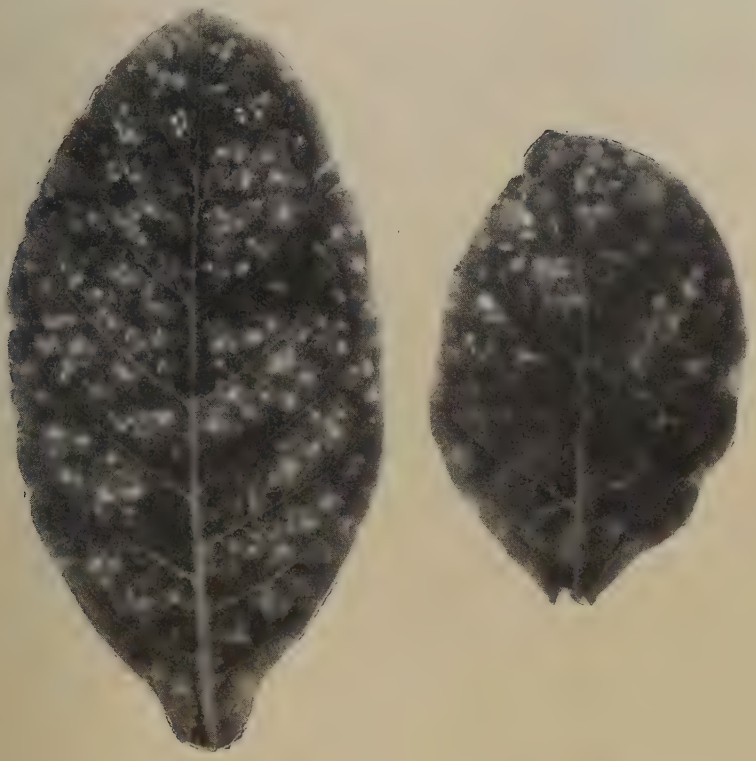
A



B

C

D



E

F

Vol. 15 — Art. 19 Dezembro de 1944

COMPORTAMENTO DO VIRUS DA ENCEFALOMIELITE INFECCIOSA DO CAVALO POR INOCULAÇÃO NA MEMBRANA CORIOALANTOIDE DE EMBRIÃO DE MARRECO

POR

V. Carneiro

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Uma técnica importante de trabalho, no estudo dos virus, é iniciada em 1931, quando WOODRUFF e GOODPASTURE (10) demonstram, pela primeira vez, a possibilidade de cultura do virus do epitelioma contagioso das aves por inoculações realizadas na membrana corioalantoide de embrião de pinto. A mesma técnica era já realisada desde 1911 por ROUS e MURPHY no estudo dos sarcomas.

No estudo dos virus o método adquiriu logo em seguida considerável interêsse experimental e aplicado, quando novas experiências demonstraram a possibilidade de sua extensão a numerosos outros virus, assim como à medida que as mais variadas aplicações foram retiradas do seu emprêgo sistematizado nos laboratórios. Foi possível, nessas condições, obter culturas com alta concentração de material virulento, muito superior à que é fornecida por material de animais inoculados ou por culturas de tecido. As lesões histologicas puderam ser examinadas em um novo material de estudo, muito mais sensivel. Culturas puras puderam ser alcançadas com maiores facilidades. A pesquisa de anticorpos neutralisantes do virus pôde ser realisada por inoculação das misturas virus-sôro no novo material sensivel. O isolamento e mesmo a identificação de alguns virus puderam ser assim realisados. E finalmente, vacinas de alto poder antigênico foram obtidas pela nova técnica, de grande superioridade, em alguns casos, sôbre as vacinas primitivas, obtidas de órgãos de animais sensiveis à infecção experimental. Além disso, variantes da técnica original de inoculação na membrana corioalantoide foram realisadas, e o método original foi explorado por meio de outras técnicas de inoculação, como no saco da gema, nos vasos de corioalantoide, e por via cerebral no embrião.

A lista dos virus até agora ensaiados por inoculações em embrião de pinto é hoje longa. Infelizmente nem todos os virus puderam ser cultivados pela nova técnica; e pode-se mesmo separar os virus até agora conhecidos, como o faz BURNET (1), em dois grupos:

o dos que se desenvolvem em embrião de pinto e o dos que forneceram resultados negativos nas experiencias até agora realisadas.

No entanto é curioso verificar que, apesar da extensa literatura que o assunto possue, variando as técnicas e os objetivos, a experimentação tem sido limitada quase exclusivamente ao trabalho com embriões de pinto. Embriões de outras especies de aves não têm sido explorados como material de experiência. Êste fato deve, sem dúvida, estar ligado à maior facilidade de aquisição e de produção industrial de ovos de galinha, principalmente nos estudos em série e nos trabalhos de rotina. Nesse sentido, revendo a literatura depois de realizados os ensaios que vamos relatar, só encontramos as experiencias de GALLOWAY (5) com o virus aphtoso em embrião de pato, de resultados negativos, e os de HIMMELWEIT (7) ainda em embriões de pato, realizados com o virus vacínico, e com o da ectromelia, mas com outro objetivo especial, isto é, o de estudar os corpusculos elementares e as inclusões. Mesmo entre os autores de mais longa experiência no assunto não se encontram referencias ao uso de ovos de outras especies, nem nos trabalhos especiais dedicados à cultura em ovos embrionados (1-8-9).

Diante de uma ocasião favoravel, julgamos que seria interessante explorar o assunto nessa nova direção, dispondo de embriões de outras espécies de aves e de um material de trabalho ideal para êste genero de experiencias, como os virus da encefalomielite infecciosa do cavalo. Os resultados satisfatorios prontamente obtidos em um primeiro ensaio, com todos os testes de controle seguramente realizados, constituem o assunto dêste trabalho. Um ensaio completo é feito em embrião de marreco Pequim, e um outro, preliminar, é realizado em ovo de ganso.

Depois das experiencias de HIGBIE e HOWITT (6) os virus da encefalomielite infecciosa dos equídeos se prestam admiravelmente para explorar êste novo aspeto do problema da sensibilidade ou da resistência do meio de cultura constituido pelos embriões das diversas especies de aves. Embora imunologicamente distintos, os três tipos, oeste, leste e venezuelano, não apresentam diferenças essenciais de comportamento quando inoculados na membrana corioalantoide de embriões de pinto.

De um lado assinalam-se as seguintes facilidades para êste gênero de ensaios: desenvolvem-se em ótimas condições; pela titulagem de diluições seriadas, inoculadas em cobaias e camundongos por via cerebral, fornecem títulos infectantes muito altos: produzem lesões congestivas e hemorrágicas acentuadas; têm uma ação muito rapida; têm efeito letal sôbre o embrião.

De outro lado, oferecem ainda controles seguros de desenvolvimento, que são dados, alem do efeito letal sôbre o embrião, e das lesões gerais, pela titulagem por via cerebral das culturas inoculadas em diluições seriadas na cobaia ou no camundongo por via cerebral, e pelo controle do valor antigenico das vacinas preparadas dessas culturas, inativadas pelo formol.

Trabalhamos com embriões de marreco Pequim (*Anas boschas*) com resultados muito satisfatórios, idênticos, aos melhores que podem fornecer embriões de pinto, de modo que nenhuma diferença em relação a êstes se verifica. E uma única experiência, cercada de todos os controles, foi realizada. Fizemos ainda um ensaio com ovo de ganso (*Anser cinereus*), com resultado inferior, o que se deve atribuir a condições defeituosas que se encontram num ensaio isolado. Porque não foi facil obter, nas nossas condições de trabalho, ovos embrionados de ganso em grande numero, e seria necessário realisar uma criação especial com este objetivo.

Vamos relatar os dois ensaios, sendo o de embrião de marreco, completo, com controle de título do virus nos embriões inoculados e controle do valor antigenico da vacina obtida.

TÉNICA — Um lote do ovos de marreco de Pequim é incubado no laboratório segundo a técnica habitual em incubadora elétrica. Cerca de 10 dias depois do início da incubação, os ovos são examinados por transiluminação, os impresteáveis são removidos e os restantes conservados a 102°-103° F.

No ovo de galinha a eclosão se faz no 21.° dia e as inoculações são realizadas em geral, no 10.°-12.° e mesmo no 14.° dia de incubadora. No ovo de marreco o nascimento se faz no 28.° dia, em geral, e nessas condições as inoculações realizados do 14.° ao 18.° dia deviam estar dentro de limites aproximativos razoaveis.

As inoculações são realizadas em 18 embriões de marreco, de 17 dias de incubadora, segundo a técnica de Burnet, de formação de uma câmara de ar artificial, com ligeiras modificações já usadas na nossa rotina.

O virus utilisado é a amostra brasileira de encefalomielite infecciosa do cavalo (2) que isolamos em 1937, em São Paulo, e que vem sendo mantida por passagens cerebrais pela cobaia e conservada em glicerina fosfatada de pH 7.2. Do ponto de vista imunológico, esta amostra é uma variedade do virus leste típico (3-4). Uma emulsão de virus é preparada a 1p.10 em água fisiológica, de material de cerebro de cobaia conservado a — 4°C durante 34 dias. Esta emulsão inicial é centrifugada a 2.000 r. m. durante 10 minutos. O sobrenadante é removido e serve ao preparo de uma diluição a 1p.100 que é usada para as inoculações. Cerca de 0,05 cc são inoculadas em cada ovo. Os ovos inoculados são fechados por uma mistura de cera e parafina e mantidos em seguida, na estufa, a 38°. A mesma emulsão 1p.100 inoculada nos embriões é provada com resultados positivos, em duas cobaias, inoculadas por via cerebral com 0,1 cc. As cobaias revelam sintomas típicos e morrem em 2½-3 dias.

Cerca de 24 horas e meia depois da inoculação os 18 ovos são abertos, depois de um exame no ovoscópio.

A abertura dos ovos mostra logo as características gerais de um resultado positivo: a corioalantoide se mostra edemaciada, de aspeto brilhante, e os embriões de marreco estão: mortos, 3; de movimento diminuidos e agonisantes, 5; apenas hemorragicos, cianoticos e tipicos, 6; despresados, 4.

Os 14 embriões são colocados em um recipiente metálico e triturados em um agitador elétrico durante cerca de 20 m., de modo a se obter uma massa fina; uma emulsão do triturado é preparada a 20% em água fisiológica, e filtrada em gase. Cêrca de 10 cc dessa emulsão são retirados para titulagem do teor de virus e o restante é formolado a 0,4% para preparo de uma vacina de embrião de marreco.

Dois controles seguros são realizados: em primeiro lugar é feita a determinação da DLM do virus no material de embriões; em segundo, é feito o controle do valor antigenico da vacina.

1 — DLM do virus — Os 10cc da emulsão a 20%, de embriões e corioalantoides, são centrifugados a 2.000 r.m. — 10 m. O sobrenadante é removido e diluido sucessivamente em agua fisiológica, de modo a fornecer uma série de diluições de 10^{-2} a 10^{-9}. Inoculações são realizadas com 0,1 cc, por via cerebral, usando duas cobaias de 250-300 grs, para cada diluição, e utilizando-se as diluições de 10^{-5} a 10^{-8}. Os resultados, conforme se verifica na tabela 1, mostram que o material é regularmente infectante para a cobaia até 10^{-7}, e que a diluição 10^{-8} ainda é infectante para uma, de duas cobaias inoculadas. Êste resultado é muito demonstrativo, idêntico aos melhores obtidos em numerosas dosagens feitas com embrião de pinto.

As cobaias inoculadas revelam sintomas iniciais ao cabo de 3½ - 4 dias, e em seguida sintomas típicos, paralisias, sintomas encefálicos propriamente, tremores generalizados, baba, queda, e morte.

2 — Controle do valor antigênico da vacina — A emulsão a 20%, formulada, fornece uma vacina cujo valor antigênico é provado, conforme se verifica na tabela 2. Quatro cobaias recebem, por via subcutânea, duas doses de 0,5 cc de vacina com uma semana de intervalo. A prova de infecção, 11 dias depois da segunda dose vacinante, é realizada com 0,1 cc por via cerebral, de virus brasileiro 1p.10, que corresponde, conforme ensaios anteriores, a 1.000 - 10.000 DLM cerebrais. Duas cobaias normais, inoculadas com o virus, revelam sintomas típicos em 2½ - 3 dias, e morrem; as cobaias vacinadas conservam-se normais ao cabo de 15 dias.

ENSAIO EM EMBRIÃO DE GANSO — Nas nossas condições de trabalho, a obtenção de ovos de grandes dimensões é em geral dificil. Foi possível reunir um lote de 20 ovos de ganso, mas ao cabo de 10 dias de incubadora só foi

possível aproveitar um único embrionado. A inoculação é feita em um embrião de 16 dias, com 0,2 cc de virus brasileiro a 1p.50, emulsão centrifugada a baixa velocidade. O contrôle de virulência da emulsão inoculada na corioalantoide é feito em duas cobaias, por via cerebral, com resultados positivos. A inoculação na corioalantoide é feita como na experiência anterior. Ao cabo de 28 horas de estufa a 37°,5—, o ovo é aberto e o embrião está morto, congestionado, cianótico, apresentando zonas hemorrágicas sobretudo ao nivel das patas.

Um ovo de ganso pesa cerca de 170 grs e fornece cerca de 30 grs embrião adicionado da membrana corioalantoide, isto é, cerca de três vezes o peso de um embrião de pinto. O contrôle realizado pela determinação do título infectante da cultura feito nas mesmas condições do ensaio anterior revela que as diluições 10^{-4} - 10^{-5}, inoculadas por via cerebral na cobaia, são infectantes. As cobaias inoculadas revelam sintomas ao cabo de 3-4 dias. As diluições 10^{-6} - 10^{-7} - 10^{-8}, inoculadas na cobaia, fornecem resultados negativos. Passagens de cérebro das cobaias que receberam a diluição final infectante são realizadas em outras cobaias, com resultados positivos. Como ensaio isolado, êste resultado é satisfatório e parece indicar que uma experiência em melhores condições deve revelar indices infectantes idênticos aos de embrião de pinto.

RESUMO E CONCLUSÕES

É curioso verificar que, apesar da importante soma de trabalhos realizados sôbre cultura de virus em embrião de pinto, nenhuma referência se encontra na literatura relativa à sensibilidade ou resistência dos embriões de outras espécies de aves, si excetuarmos as experiências de HIMMELWEIT, com o virus vacínico e com o da ectromelia.

Uma experiência é realizada com o virus de encefalomielite infecciosa do cavalo, utilisando a amostra brasileira, que é uma variedade do tipo leste, por inoculações em embrião de marreco (*Anas boschas*, de raça Pequim).

Resultados satisfatórios são obtidos, idênticos aos melhores fornecidos pelas inoculações em embrião de pinto: o virus produz as mesmas lesões, efeito letal sôbre o embrião e a DLM das culturas para a cobaia é de 10^{-8}.

Uma vacina formolada de embriões de marreco protege as cobaias vacinadas contra 1.000 - 10.000 DLM cerebrais.

O embrião de pinto utilisado no preparo da vacina fornece um pêso médio de 12 grs., e o de marreco, de 18 grs, o que representa um rendimento de 50%, com economia de trabalho seriado.

Um ensaio em embrião de ganso revela títulos infectantes para a cobaia por via cerebral, de 10^{-4} - 10^{-5}. Um ovo de ganso pesa cêrca de 170 grs e o embrião de 16 dias, 30 grs.

O resultado dêsses ensaios sugere a utilidade de se estenderem as investigações de sensibilidade a outros tipos de aves, como o cisne,

TABELA 1

Determinação do título infectante do virus da encefalite equina em cultura de embrião de marreco

Cobaias	Diluições do virus	Inoculações	Resultado									
			21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
421	10^{-9}	20.7.44 - 0,1 cc										—
422	»	»										—
423	10^{-8}	»										—
424	»	»					S. T	P. S				+
425	10^{-7}	»					S. T	P. S				+
426	»	»				S. I	S. T	M				+
427	10^{-6}	»				S. T	P. S					+
428	»	»				S. I	M					+
429	10^{-5}	»				S. T	P. M					+
430	»	»				S. T	P. S					+

DLM da cultura e da vacina: $0,1 \times 10^{-8}$

S. I — sintomas iniciais
S. T — sintomas típicos
P — paralisias
S — sacrificada
M — morte.

o avestruz, a ema, etc., e ainda a de se examinar a possibilidade de embriões resistentes aos virus já cultiváveis, serem sensiveis aos virus que não se desenvolvem em embrião de pinto.

TABELA 2

Controle do valor antigênico da vacina de encefalomielite do cavalo obtida de embrião de marreco

Cobaias	Vacinação	Prova de infecção	Resultado
500	22.8.44 1.ª dose - 0,5 cc. 28.8.44 2.ª dose	8.9.44 - V. bras. 1p.10	—
501	» »	»	—
502	» »	»	—
503	» »	»	—
Controle			
519		8.9.44 - V. bras. 1p.10	+
520			+

As quatro cobaias vacinadas recebem 0,1 cc de virus a 1p.10 que conforme trabalhos anteriores, corresponde a 1.000-10.000 DLM cerebrais para cobaia, sem revelarem qualquer alteração.

THE BEHAVIOR OF THE VIRUS OF EQUINE ENCEPHALOMYELITIS ON THE CHORIOALLANTOIC MEMBRANE OF THE DUCK EMBRYO

Abstract

In spite of the large number of papers published on virus culture in chick embryo, the embryos of other bird species have not been tested as to their suitability for this line of research.

The experiment described studies the behaviour of the virus of equine encephalomyelitis, Brazilian strain, by inoculation of the chorio-allantois of duck embryo (Anas boschas, *variety Peking). The results are indentical with those obtained with chick embryo. The virus cultures in duck embryo are regularly fatal for the guinea-pig up to the dilution* 10^{-7}. *A formolized vaccine of duck embryo in two doses of 0.5 c. c. each protects the guinea pig against 1000 cerebral lethal doses.*

One experiment made with goose embryo (Anser cinereus, *variety Toulouse), shows that the culture is fatal for the guinea pig, by cerebral route, to dilutions* 10^{-4} *and* 10^{-5}.

BIBLIOGRAFIA

1 — Burnet, F. M. — 1938 — The growth of viruses on the chorioallantois of the chick embryo. *Handbuch der Virusforschung*. Erste Hälfte, 419-446. Julius Springer, Wien.

2 — Carneiro, V. — 1937 — A encefalomielite infecciosa dos equídeos no Brasil. *Arq. Inst. Biol.*, S. Paulo, 8: 115-134.

3 — Carneiro, V. — 1944 — Estudos de imunidade cruzadas entre o virus brasileiro da encefalomielite infecciosa do cavalo e os virus americanos — pelas provas de soro-neutralisação. *Arq. Inst. Biol.*, S. Paulo, 15: 209-238.

4 — Carneiro, V. e R. Cúnha — 1943 — Estudos sôbre a encefalomielite infecciosa dos equídeos no Brasil. *Arq. Inst. Biol.*, S. Paulo, 14: 157-194.

5 — Galloway, I. A. — 1937 — Attemps to propagate the virus of foot-and-mouth disease in eggs. *Fifth Progress Rep. of Foot-and-Mouth Disease Research Comm.*, 369-376. London.

6 — Higbie, E. and B. Howitt — 1935 — The behavior of the virus of equine encephalomyelitis on the chorioallantoic membrane of the developing chick. *J. of Bact.*, 29: 399-406.

7 — Himmelweit, F. — 1938 — Observations on living vaccinia and ectromelia viruses by high power microscopy. *British J. Exp. Path.*, 19: 108-123.

8 — Mesrobeanu, J. — 1938 — Purification biologique du virus vaccinal. *Les utravirus des maladies humaines*, 1: 252-256. Editor: Maloine. Paris.

9 — Von Rooyen, C. E. and A. J. Rhodes — 1940 — Virus Diseases of Man, p. p. 113-120. *Oxford Med. Publications*, London.

10 — Woodruff, A. and E. Goodpasture — 1931 — The susceptibility of the chorioallantoic membrane of chick embryos to infection with the fowlpox virus. *The Am. J. of Path.*, 7: 209-222.

Vol. 15 — Art. 20 Dezembro de 1944

SÔBRE O RECONHECIMENTO DE PORTADORES NA CÓLERA AVIÁRIA

POR

P. Nobrega e R. C. Bueno

Do Instituto Biologico de S. Paulo

O aparecimento de cólera num lote de aves depende, na grande maioria dos casos, da presença de aves portadoras de *Pasteurella avicida* no muco naso-bucal, as quais são responsáveis pela repetição periódica de surtos da doença, numa granja anteriormente infectada (1, 3, 4, 2). A profilaxia da cólera depende fundamentalmente da eliminação dêsses portadores, cujo reconhecimento se faz pela identificação do germe no muco bucal (1, 3, 2); a literatura registra, todavia, métodos para reconhecimento dos portadores, baseados em provas de aglutinação lenta (2) ou rápida (5), esta com antigeno colorido e sangue total. O presente trabalho tem por fim demonstrar que o diagnóstico sorológico é falho e que a inoculação de animais de laboratório, com o muco bucal das aves suspeitas, representa ainda o melhor processo para identificação das aves portadoras de cólera.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a experiência empregamos 50 galinhas, reconhecidas um mês antes como portadoras, pelo processo da inoculação em pombos, preconizado por NOBREGA e REIS (2). De cada ave retira-se, por meio de pipeta estirada, um pouco do muco da fenda palatina, que é emulsionado em 3 cm³ de caldo simples. O material permanece 2 h na estufa a 37°C, sendo então semeado em placa de agar com 1% de sangue hemolisado, e inoculado na dose de 0,5 cm³ no músculo dum pombo, 0,25 cm³ no peritônio de 2 camundongos, 1 cm³ no músculo duma galinha normal e 1 cm³ no músculo da própria galinha submetida a exame.

Todo animal morto é autopsiado, fazendo-se cultura do fígado em meio de agar-sangue hemolisado; sòmente os casos com isolamento de *P. avicida* são considerados positivos para efeito de reconhecimento dos portadores. O período de observação dos animais é de 7 dias.

Para as provas de aglutinação lenta, empregamos uma amostra azul de *P. avicida*, aglutinável até a diluição 3200 por um sôro preparado em coelho com essa mesma amostra; de cada ave retira-se 1 cm³ de sangue que é deixado coagular, fazendo-se depois provas de aglutinação com o sôro diluido a 1:25 e 1:50. A prova de aglutinação rápida é feita com sangue total e antígeno colorido, preparado de acôrdo com

a técnica descrita por SHOOK e BUNYEA (5): a cultura duma amostra azul em agar-sôro durante 24 h a 37°C é suspensa em água fisiológica com 1% de formol; ajustar a turvação a 75 vezes o tubo 1 de McFarland; adicionar 0,1 cm³ duma solução a 1% de cristal violeta e deixar o antígeno vários dias à temperatura ambiente antes do uso.

RESULTADOS

A tabela 1 mostra o número de portadores revelado pelo processo de inoculação em animais.

TABELA 1

Resultado	Camundongo		Pombo		Pombo + Camundongo		Galinha portadora		Galinha normal	
	Total	%	Total	%	Total	%	Total	%	Total	%
Positivo . . .	45	90	45	90	50	100	3	6	1	2
Negativo . .	5	10	5	10	0	0	47	94	6	94

Na tabela 2 estão consignados os resultados da pesquiza de portadores por meio de provas sorológicas e semeadura do muco em placas de agar-sangue.

TABELA 2

Resultado	Aglutinação lenta		Aglutinação lenta		Semeadura em agar	
	Total	%	Total	%	Total	%
Positivo	0	0	0	0	3	6
Negativo	50	100	50	100	47	94

Dos 50 casos revelados pela inoculação combinada de pombos e camundongos, 40 foram comuns a ambos os testes isoladamente, 5 foram positivos só para pombos e 5 só para camundongos.

A morte dos 45 pombos verificou-se em 24 h em 30 casos, 48 h em 8, 72 h em 5 e 96 h em 2; a inoculação em camundongos determina a morte de ambos os animais em 39 casos e dum animal apenas em 6 casos; a morte de ambos os animais ocorre após 24 h em 25 casos e após 48 h em 4 casos; em 10 vezes observa-se a morte dum animal em 24 h e do segundo, em 48 h. Nos 6 casos de morte dum animal apenas, esta ocorre em 24 h em 3 casos e 72 h nos outros 3.

DISCUSSÃO

Nas condições da experiência, o processo da inoculação do muco bucal em pombos e camundongos revelou-se o melhor processo para identificação de aves portadoras de cólera, confirmando o trabalho

anterior de NOBREGA e REIS (2) feito com pombos. A inoculação dum pombo, ou de 2 camundongos, revela 90% dos portadores, ao passo que a combinação dos 2 processos resulta em 100% de eficiência.

A semeadura em placa agar-sangue da suspensão do muco em caldo simples, permitiu revelar a *Pasteurella avicida* apenas 6 vezes num total de 50 portadoras. Resultados melhores se obtêm retirando-se o muco por meio dum chumaço de algodão colocado na extremidade dum bastão e espalhando-se o material na superfície duma placa de agar-sangue (1,3). Êste processo é, entretanto, pouco prático, porque a flora bucal é muito variada e a contaminação é geralmente grande, o que torna o exame das colônias muito trabalhoso, tanto mais quanto numerosas bactérias diversas de *Pasteurella avicida* podem formar colônias indistinguíveis das desta última.

A identificação dos portadores, por meio de provas de aglutinação lenta ou rápida, esta última segundo a técnica de SHOOK e BUNYEA, deu resultados completamente negativos. Esta observação confirma a de NOBREGA e REIS (2) que, num exame feito em 50 aves seguramente portadoras, observam aglutinação num único caso até a diluição máxima de 1:50. O teste foi feito com uma amostra de *P. avicida* aglutinável até a diluição 1:5120 por um antisôro preparado em coelho. Êste resultado negativo é aliás de prevêr, dado o fraco valor antigênico da *P. avicida.*

A inoculação do muco na própria galinha portadora ou numa galinha normal revelou respectivamente 1 a 3 portadores num total de 50, o que provàvelmente pode ser explicado pela quantidade relativamente pequena de bactérias no muco bucal; de outro lado, êste fato demonstra também a maior sensibilidade do pombo e do camundongo à infecção experimental.

CONCLUSÕES

A inoculação do muco bucal num pombo e 2 camundongos permite revelar as portadoras de cólera em 100% dos casos; considerado isoladamente, cada processo apresenta uma eficiência relativa de 90%; a inoculação dum camundongo apenas, permite reconhecer 84% dos portadores.

A prova de aglutinação pelo método lento ou pelo método rápido com antígeno colorido e sangue total, segundo técnica de SHOOK e BUNYEA, revelou-se completamente negativa na identificação de aves seguramente portadoras.

A inoculação da galinha portadora, com o próprio muco, apenas determina a morte dum animal em 50 casos, o que não é consequência duma maior resistência da galinha portadora, pois o muco inoculado

em galinhas normais apenas causa a morte de 3 animais em 50 casos. Êste resultado demonstra, todavia, a maior sensibilidade do pombo e do camundongo à infecção experimental.

ON THE DETECTION OF FOWL CHOLERA CARRIERS

Abstract

By inoculating the mouth mucus of hens known to be carriers of fowl cholera, at the same time into mice and pigeons it was possible to detect a higher percentage of carriers than by inoculating the mucus either into pigeons or mice.

The authors emphasize as the best method for the detection of fowl cholera carriers the inoculation of the mouth mucus of each fowl to be tested into one pigeon and two mice. This procedure permits of detecting 100% of the carriers in a given flock. The inoculation of a single pigeon or of two mice per fowl would detect only 90% of the carriers. The inoculation of a single mouse per fowl gives a lower percentage (84%) of detected carriers.

Agglutination tests performed according to the techniques described by SHOOK *and* BUNYEA *completely failed as a mean to revealing, fowl cholera carriers.*

In the course of their experiments the authors have also observed that the inoculation of fowls known to be carriers of fowl cholera with their own infected mucus causes the death of only 2% of the birds. This should not be regarded as a consequence of a higher resistance of the carriers as compared to normal birds, since the number of deaths among normal fowls inoculated with their own mucus does not exceed 6%.

BIBLIOGRAFIA

1 — HUGHES, TH. P. — 1930 — The epidemiology of fowl cholera. *Jour. Exp. Med.*, 51: 225-238.

2 — NOBREGA, P. e J. REIS — 1937 — Sôbre o reconhecimento de portadores na cólera aviária e a persistência da Pasteurela avicida nesses animais. *Arq. Inst. Biol.*, S. Paulo, 8: 183-188.

3 — PRITCHETT, I. W., F. R. BEAUDETTE e TH. P. HUGHES — 1930 — The epidemiology of fowl cholera. *Jour. Exp. Med.*, 51: 249-258 e 259-274.

4 — PRITCHETT, I. W. e TH. P. HUGHES — 1932 — The epidemiology of fowl cholera. *Jour. Exp. Med.*, 55: 71-78.

5 — SHOOK, W. B. e H. BUNYEA — 1939 — The detection of carriers of fowl cholera, and its control, by means of a staind-antigen rapid whole-blood test. *Poult. Scie.*, 18: 146-149.

Vol. 15 — Suplemento 1 Dezembro de 1944

IDENTIDADE DO HOSPEDEIRO DE "ELSINOË BOEHMERIAE BITANC. & JENKINS"

(CORRECT HOST OF "ELSINOË BOEHMERIAE BITANC. & JENKINS")

POR

Anna E. Jenkins & A. A. Bitancourt

Do Instituto Biologico de S. Paulo e do Bureau of Plant Industry, Soils and Agricultural Engineering, Department of Agriculture, dos Estados Unidos

Na descrição original de *Elsinoë boehmeriae* BITANC. & JENKINS (Arq. Inst. Biol., S. Paulo 12:3. 1941) o nome do hospedeiro é dado como sendo *Boehmeria caudata* SW. (Urticaceas) sob o qual os autores receberam o especimen tipo, e único desta espécie, colhido por A. S. COSTA em Tieté, Estado de São Paulo, em 8 de Fevereiro de 1939.

O Dr. A. P. VIÉGAS chamou a atenção dos autores para o fato de que o verdadeiro hospedeiro é *Vernonia polyanthes* LESS. (Compostas). O Dr. VIÉGAS escreveu que A. S. COSTA, examinando a parte do especimen incluida no herbario do Instituto Agronômico, e conhecendo a planta somente pelo nome vulgar de "assa-peixe", procurara o nome científico em "Dicionário das plantas uteis do Estado de São Paulo", de H. PEREIRA (1). Nesse trabalho, o "assa-peixe" é dado como sendo *Boehmeria caudata* SW. (Urticaceas). Conforme faz observar o Dr. VIÉGAS, isso explica a identificação erronea do hospedeiro do especimen micológico em questão. PIO CORRÊA (2) dá "assa-peixe" como o nome vulgar de *Boehmeria caudata* e de várias espécies de *Vernonia: V. grandiflora* LESS., *V. ruficoma* SCHLECH. e *V. ferruginea* LESS.. *V. polyanthes* é igualmente conhecido como "assa-peixe", como prova o fato do Dr. VIÉGAS ter reconhecido o citado especimen de herbario como a planta que êle conhecia sob êsse nome vulgar. COSTA sem dúvida também conhecia a planta sob essa denominação e obteve o nome científico consultando PEREIRA.

Com *E. boehmeriae*, 4 espécies de *Elsinoë* são descritas em Compostas, na publicação que contém a descrição da primeira (3); as outras são: *E. caleae* sôbre *Calea pinnatifida* LESS., *E. ractii* sôbre *Ambrosia polystachya* D. C. e *E. deslandesii* sôbre *Moquinia polymorpha* (LESS.) DC.

---

(1) Secretaria da Agricultura, Indústria e Comércio do Estado de São Paulo. 720 pp. 1939.
(2) Corrêa, M. Pio — 1926 — "Dicionário das plantas uteis do Brasil". Rio de Janeiro. Imprensa Nacional. pp. 195-196.
(3) Bitancourt, A. A. & Jenkins, A. E. — 1941 — "Treze novas espécies de Elsinoë do Brasil". Arq. Inst. Biol., S Paulo, 12: 1-20.

As seguintes emendas devem ser feitas, no trabalho que acaba de ser citado:

Página 1, na última linha, suprimir *Boehmeria.*

Página 2, substituir a primeira linha por: *Vernonia polyanthes,* nativa do Brasil; *Cryptostegia.*

Página 2, parágrafo 2, linha 2, substituir *Boehmeria* por *Vernonia.*

Página 3, último parágrafo, linhas 1 e 2, substituir *Boehmeria caudata* Sw. (Urticaceas) por *Vernonia polyanthes* Less. (Compostas).

Página 14, parágrafo 3, linha 7, substituir *Boehmeria caudata* por *Vernonia polyanthes.*

Página 15, parágrafo 2 do abstrato, linhas 2 e 3, substituir *Boehmeria caudata* (Urticaceas) por *Vernonia polyanthes* (Compostas).

Página 16, estampa 2, linha 2, substituir *Boehmeria caudata* por *Vernonia polyanthes.*

São Paulo
TIPOGRAFIA BRASIL
ROTHSCHILD LOUREIRO & CIA. LTDA.
Rua 15 de Novembro, 201
1944